

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública (Historia de la Ciencia)



TESIS DOCTORAL

Estudio de la seguridad alimentaria de la carne. Carne de jabalí y de ciervo y su impacto en la salud pública

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aitor Rípodas Navarro

Directores

José Luis Rodríguez-Marín Roy
José Napoleón Pérez Farinós

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e
Historia de la Ciencia



ESTUDIO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA
CARNE DE CAZA. CARNE DE JABALÍ Y DE
CIERVO Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA.

D. AITOR RÍPODAS NAVARRO

MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e Historia de
la Ciencia



ESTUDIO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA
CARNE DE CAZA. CARNE DE JABALÍ Y DE CIERVO Y
SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR

D. AITOR RÍPODAS NAVARRO

DIRECTORES

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ-MARÍN ROY

JOSÉ NAPOLEÓN PÉREZ FARINÓS

MADRID, 2016

**EL CORONEL VETERINARIO D. JOSE LUIS RODRÍGUEZ-MARÍN ROY,
JEFE DE LA UNIDAD DE SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA
SUBINSPECCIÓN DE APOYO VETERINARIO. INSPECCIÓN GENERAL DE
SANIDAD DEL MINISTERIO DE DEFENSA**

CERTIFICA

Que el proyecto de tesis doctoral titulado **“ESTUDIO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA CARNE DE CAZA. CARNE DE JABALÍ Y DE CIERVO Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA”** ha sido realizada bajo mi dirección por el licenciado en Veterinaria Don Aitor Rípodas Navarro y reúne todos los requisitos científicos y formales para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Madrid a catorce de octubre de dos mil dieciséis.



Fdo. José Luis Rodríguez-Marín Roy



NAPOLEÓN PÉREZ FARINÓS, profesor asociado del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA, que el trabajo “ESTUDIO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA CARNE DE CAZA. CARNE DE JABALÍ Y DE CIERVO Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA” ha sido realizado por D. Aitor Rípodas Navarro bajo mi dirección y tutela.

Dicho trabajo reúne todas las condiciones para proceder a su defensa pública como Tesis Doctoral. Durante la ejecución del mismo el doctorando ha demostrado su capacidad en todos los aspectos de la investigación y de la elaboración de la Tesis. Está adecuadamente justificada, apoyada por una pregunta de investigación y unos objetivos correctamente formulados. La metodología ha sido diseñada y llevada a cabo con el máximo rigor científico, y los resultados están presentados con claridad. Su aportación al conocimiento científico es sustantiva y original, y de sus hallazgos se derivan conclusiones con utilidad en la práctica clínica.

Y para que así conste a efectos académicos firmo el presente certificado en Madrid a 21 de octubre de 2016.

Napoleón Pérez Farinós

*“Cada hogaza de pan es una trágica historia sobre
cereales que pudieron haber sido cerveza”*

(Anónimo)

“Difficulties are just things to overcome after all”

Sir Ernst Shackleton

A mis padres

A mi gordita

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis dos directores de tesis, los Dres. D. José Luis Rodríguez-Marín Roy y D. Napoleón Pérez Farinós, por darme el ánimo y la confianza para la realización de este trabajo.

También quiero agradecer la inestimable ayuda recibida por parte de Juana y David, mis tutores durante la realización del presente trabajo, siempre dispuestos a resolver mis dudas.

Además, quiero dar las gracias a las siguientes personas que han contribuido de forma desinteresada en el trabajo que aquí se presenta:

Al General D. Carlos Agudo Mayorga y al Coronel D. Ángel Santos Ramírez, Directores del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa durante mi período de formación como especialista, por su apoyo y disponibilidad para que se pudiera llevar a cabo el trabajo.

A mi amigo Manu, también mi tutor durante mi etapa como “bisoño alimentario”, por toda la paciencia que ha tenido conmigo y por todos los buenos consejos que me ha dado.

A Dani y Alberto, por estar siempre dispuestos para resolverme mis dudas y enseñarme tantas cosas; de Bromatología y Biología Molecular por supuesto, pero también sobre estilismo, aunque en esto último no os haga mucho caso.

A Luis Ángel, por su comprensión, ánimos y la ayuda desinteresada en la realización de este trabajo.

A Lola y Javier, por la gran ayuda prestada durante el procesado de las muestras.

A Maite, por la ayuda que me ha prestado en todos los trámites administrativos para la presentación de este trabajo.

A OSBRUMA S.A., por la aportación de muestras y su total predisposición y colaboración con este trabajo.

A todos mis compañeros del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa, por su amistad, confianza y profesionalidad.

A mis padres, por todos los esfuerzos y sacrificios que han realizado a lo largo de su vida por mí; por todos los consejos y ánimos que me han dado siempre que los he necesitado; por la exigencia que han tenido conmigo en todas las actividades que he realizado (aunque de esto me haya dado cuenta con el paso de los años); por estar siempre ahí...muchas gracias porque lo que soy, os lo debo a vosotros.

Y, por último, este trabajo no habría sido posible sin el amor incondicional de mi gordita. Muchas gracias Beatriz por todos los ánimos que me has dado durante estos intensos años, por todos los sacrificios que has tenido que realizar durante la realización de éste trabajo (por lo menos, un 40 % es tuyo, je je), por todo lo que me has dado durante estos ya más de cuatro años...

ÍNDICE.

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	XXI
2. RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.....	XXV
2.1 RELACIÓN DE FIGURAS.....	XXVII
2.2 RELACIÓN DE TABLAS.	XXVIII
3. RESUMEN.....	XXXI
RESUMEN.....	XXXIII
ABSTRACT.....	XXXIX
4. INTRODUCCIÓN.....	1
4.1 HISTORIA DE LA CAZA.....	1
4.1.1 Prehistoria.....	1
4.1.2. Edad Antigua.	3
4.1.3. Edad Media.....	4
4.1.4. Renacimiento e Ilustración.....	5
4.1.5. Siglo XX hasta nuestros días.	6
4.2. IMPACTO ECONÓMICO DE LA CAZA.....	7
4.3. TIPOS DE CAZA, MODALIDADES Y ANIMALES DE INTERÉS CINEGÉTICO....	8
4.3.1. Caza mayor.	9
Montería.....	9
Rececho y aguardo.....	9
Batida.....	10
El gancho.....	10
Espera.....	10
4.3.2. Caza menor.	11
Caza en mano.....	11
Caza al ojeo.	11

Al salto con perro.	11
Caza con reclamo.	12
Al paso.	12
4.3.3. Animales de interés cinegético.	13
Ciervo (<i>Cervus elaphus</i> , Linnaeus 1758).	14
Jabalí (<i>Sus scrofa</i> , Linnaeus 1758).	16
4.4 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA CARNE DE CAZA.	20
4.4.1. Contenido proteico de la carne de caza.	23
4.4.2. Contenido en grasa total intramuscular de la carne de caza.	23
4.4.3. Contenido en humedad de la carne de caza.	25
4.4.4. Contenido en cenizas de la carne de caza.	26
4.5 PELIGROS BIOLÓGICOS DE LA CARNE DE CAZA.	26
4.5.1 Parásitos transmitidos por la carne de caza.	26
<i>Toxoplasma gondii</i>	26
<i>Trichinella</i> spp.	27
4.5.2. Bacterias transmitidas por la carne de caza.	31
<i>Salmonella</i> spp.	32
<i>Escherichia coli</i> productoras de toxinas Shiga (STEC).	35
<i>Listeria monocytogenes</i>	41
Indicadores de calidad microbiológica.	42
Otras bacterias transmitidas por la carne de caza	45
4.5.3. Virus transmitidos por la carne de caza.	46
Virus de la hepatitis E.	46
4.5.4 Contaminación abiótica de la caza.	46
Plomo.	47
Cadmio.	48

4.6. LA LEGISLACIÓN DE LA CAZA.	48
4.6.1 Historia de la legislación cinegética.....	48
4.6.2. Legislación europea.	50
4.6.3. Legislación española.	50
4.6.4. Legislación autonómica.....	51
5. JUSTIFICACIÓN.	55
6. HIPÓTESIS.....	59
7. OBJETIVOS.	63
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
8.1. MUESTRAS ANALIZADAS DE CARNE DE CAZA.	69
8.2. MATERIALES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.	70
8.2.1. Preparación de la muestra inicial.	70
8.2.2. Recuento de microorganismos indicadores de calidad microbiológica.	71
8.2.3. Investigación de <i>Salmonella</i> spp. mediante método automatizado.....	75
8.2.4. Método horizontal de confirmación de positivos a <i>Salmonella</i> spp.	76
8.2.5. Recuento en placa de <i>Listeria monocytogenes</i>	80
8.3 MATERIALES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	82
8.3.1. Extracción de ADN.....	82
8.3.2. Investigación de <i>Salmonella</i> spp. mediante Real Time PCR.	82
8.3.3. Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante Real Time PCR.....	83
8.3.4. Investigación de STEC mediante Real Time PCR.....	83
8.4. MATERIALES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE MACRONUTRIENTES....	84
8.4.1. Preparación de la muestra inicial.	84
8.4.2. Determinación de proteínas mediante volumetría (método Kjeldahl).....	84

8.4.3. Determinación de Grasas por gravimetría (método Soxhlet)	85
8.4.4. Determinación de Humedad por gravimetría	86
8.4.5. Determinación de Cenizas por gravimetría	86
8.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	87
8.5.1. Preparación de la muestra inicial.	87
8.5.2. Recuento de microorganismos indicadores de calidad microbiológica.	88
8.5.3. Investigación de <i>Salmonella</i> spp. mediante método automatizado.....	90
8.5.4. Método horizontal de confirmación de positivos a <i>Salmonella</i> spp.	90
8.5.5. Método horizontal de recuento en placa de <i>Listeria monocytogenes</i>	92
8.6 MÉTODO UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR.	93
8.6.1. Extracción de ADN.....	93
Procedimiento de extracción de ADN para investigación de <i>Salmonella</i> spp. y cribado de STEC.....	93
Procedimiento de extracción de ADN para investigación de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	94
8.6.2. Investigación de <i>Salmonella</i> spp. mediante Real Time PCR.	95
8.6.3. Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante Real Time PCR.....	96
8.6.4. Investigación de STEC mediante Real Time PCR.....	97
8.7. MÉTODO UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS DE MACRONUTRIENTES.	98
8.7.1. Preparación de la muestra inicial.	98
8.7.2. Determinación de proteínas mediante volumetría (método Kjeldahl).....	98
8.7.3. Determinación de Grasas totales por gravimetría (método Soxhlet).....	100
8.7.4. Determinación de Humedad por gravimetría.....	102
8.7.5. Determinación de Cenizas por gravimetría.	104
8.7.6. Cálculo del contenido calórico.....	105

8.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO.	106
8.8.1. Variables dependientes.....	106
8.8.2. Variables independientes.....	107
8.8.3. Análisis estadístico.	107
8.9 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS RESULTADOS MICROBIÓLOGICOS OBTENIDOS Y LOS LÍMITES ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE... ..	109
8.10. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES ENTRE LAS ESPECIES DOMÉSTICAS DE ABASTO Y CINEGÉTICAS.	110
8.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	110
9. RESULTADOS.....	111
9.1. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.	113
9.1.1. Resultados: indicadores de calidad microbiológica.	113
Aerobios mesófilos totales.....	116
Enterobacterias.	117
Coliformes totales.	118
<i>E. coli</i> glucuronidasa positivos.	119
Estafilococos coagulasa positivos.	120
9.1.2. Resultados: investigación de patógenos alimentarios.	121
<i>Salmonella</i> spp.....	121
<i>Listeria monocytogenes</i>	121
<i>Escherichia coli</i> productoras de toxinas Shiga (STEC).....	122
9.2. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO NUTRICIONAL.	124
9.2.1. Contenido proteico.....	126
9.2.2. Contenido en grasa bruta intramuscular.	127
9.2.3. Contenido en agua.....	128

9.2.4. Contenido en cenizas.....	129
9.2.5. Contenido calórico.	130
9.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO.	131
9.3.1. Análisis estadístico de indicadores de calidad microbiológica.	132
9.3.2. Asociación entre el tipo de derivado cárnico y la presencia de <i>Salmonella</i> spp.....	133
9.3.3. Asociación entre el tipo de derivado cárnico y la presencia de STEC.	134
Asociación entre el tipo de derivado cárnico y los diferentes factores de virulencia.....	134
9.3.4. Asociación entre el tipo de derivado cárnico y los diferentes macronutrientes.....	136
9.4. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE.	138
9.4.1. Indicadores microbiológicos.....	138
9.4.2. Investigación de patógenos alimentarios.....	138
9.5. ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES DE LAS ESPECIES DOMÉSTICAS DE ABASTO.	139
10. DISCUSIÓN.....	141
10.1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO.....	143
10.1.1. Tipo de muestra.	143
10.1.2. Indicadores de Calidad Microbiológica.....	143
Aerobios mesófilos totales.....	144
Enterobacterias.....	144
Coliformes totales.	145
<i>E. coli</i> glucuronidasa positivos.	146
Estafilococos coagulasa positivos.	146
10.1.3. Investigación y recuento de patógenos alimentarios.	147

<i>Salmonella</i> spp.....	147
<i>Listeria monocytogenes</i>	147
<i>Escherichia coli</i> productoras de toxinas Shiga (STEC).....	148
10.1.4. Análisis nutricional.	150
Preparación de muestras.	150
Contenido proteico.	150
Contenido en grasa bruta intramuscular.....	150
Contenido en humedad.	150
Contenido en cenizas.....	151
Contenido calórico.	151
10.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	152
10.2.1. Indicadores de calidad microbiológica.....	152
Aerobios mesófilos totales.....	152
Enterobacterias.	154
Coliformes totales.	155
<i>E. coli</i> glucuronidasa positivos.	155
Estafilococos coagulasa positivos.	156
10.2.2. Patógenos alimentarios.....	157
<i>Salmonella</i> spp.....	157
<i>Listeria monocytogenes</i>	158
<i>Escherichia coli</i> productoras de toxinas Shiga (STEC).....	159
10.2.3. Análisis nutricional.	161
Contenido proteico.	161
Contenido en grasa bruta intramuscular.....	162
Contenido en humedad.	163
Contenido en cenizas.....	163

Contenido calórico.	164
10.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS OBTENIDOS Y LOS LÍMITES ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE...	165
10.3.1. Indicadores de calidad microbiológica.....	165
10.3.2. Investigación de patógenos alimentarios.....	165
10.4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES ENTRE LAS ESPECIES DOMÉSTICAS DE ABASTO Y CINEGÉTICAS.	165
10.5. LIMITACIONES.....	166
11. CONCLUSIONES.....	167
12. BIBLIOGRAFÍA.....	171

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

Animales domésticos de abasto: Especies de animales dedicados principalmente a servir de fuente alimenticia para el ser humano.

Armada: Línea de cazadores que acechan a las reses espantadas o forzadas en la batida.

Bermejos: ejemplares jóvenes de jabalí que, no siendo rayones, no han madurado. Se les denomina así debido al color de su pelaje.

Berrea: sonido que emiten los machos para atraer la atención de las hembras durante la época de apareamiento.

Biofilm: comunidades de microorganismos que crecen adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo y embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado.

Canal: el cuerpo, con o sin piel, de los animales domésticos de abasto o de especies cinegéticas después de haber sido sacrificado y eviscerado.

Carroñero: Dicho de un animal que se alimenta de carne corrompida.

Cimbel: Cordel que se ata a la punta de una vara flexible y larga, donde se ata el ave que sirve de señuelo para cazar otras.

Guardería: es el coste económico que suponen los guardas de una finca rústica o un coto.

Inspección ocular: examen realizado a las canales y vísceras de animales abatidos para observar posibles características que indiquen algún riesgo sanitario.

Mancha: Terreno que se distingue de los otros por alguna cualidad, principalmente por los tipos de plantas o su coloración.

Manga de manejo: Instalación ganadera sólida construida en forma de pasillo para que el ganado transite en fila de a uno y así poder realizar múltiples tareas, desde conteo del rebaño hasta aplicar tratamientos veterinarios.

Montero: persona que busca y persigue la caza en el monte, o la ojea hacia el sitio en el que la esperan los cazadores.

Musivaria: arte y técnica del mosaico.

Pastoreo: alimentarse de pastos

Ramoneo: Pacer las hojas y las puntas de los ramos de los árboles, ya sean cortadas antes o en tallos tiernos de poca altura.

Rayones: nombre que se da a las crías de jabalí debido a las marcas longitudinales que recorren todo el cuerpo.

Rehala: Jauría o agrupación de perros de caza mayor, cuyo número oscila entre 14 y 40.

Taxidermista: Persona que se dedica al arte de disecar a los animales para conservarlos con apariencia de estar vivos.

2. RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.

2.1 RELACIÓN DE FIGURAS.

Figura 1 Quistes de triquina en jabalí.....	19
Figura 2 Canales de ciervo con diferentes grados de engrasamiento.....	24
Figura 3 Impacto de un disparo en el "círculo de la muerte"	32
Figura 4 N° de casos de salmonelosis no tifoidea notificados al Sistema de Información Microbiológica en España. Años 2007-2015.....	34
Figura 5 Unidad de llenado TEMPO® de bioMérieux®.....	74
Figura 6 Unidad de lectura TEMPO® de bioMérieux®.....	74
Figura 7 Equipo mini-VIDAS®.....	76
Figura 8 Valores medios de microorganismos indicadores de calidad microbiológica en derivados de carne de caza y según la especie cinegética	114
Figura 9 Distribución de los resultados de los indicadores de calidad microbiológica de derivados de carne de caza (LOG ufc/g).....	115
Figura 10 Distribución del recuento de aerobios mesófilos totales según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g)	116
Figura 11 Distribución del recuento de enterobacterias según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g).....	117
Figura 12 Distribución del recuento de coliformes totales según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g).....	118
Figura 13 Distribución del recuento de <i>Escherichia coli</i> glucuronidasa positivos según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g).....	119
Figura 14 Distribución del recuento de estafilococos coagulasa positivos según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g).....	120
Figura 15 Resultados de la investigación de <i>Salmonella</i> spp. según el tipo de derivado cárnico	121
Figura 16 Resultado del cribado de STEC según el tipo de derivado cárnico	122

Figura 17 Genes que codifican factores de virulencia presentes en las muestras	123
Figura 18 Valores medios de macronutrientes en derivados de carne de caza (% m - m)	125
Figura 19 Distribución del contenido proteico según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m).....	126
Figura 20 Distribución de la grasa total intramuscular según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m).....	127
Figura 21 Distribución del contenido en agua según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m).....	128
Figura 22 Distribución del contenido en cenizas según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m).....	129

2.2 RELACIÓN DE TABLAS.

Tabla 1 Evolución del número de trofeos homologados en España. Quinquenios 1971 – 1975 y 1996 – 2000	6
Tabla 2 Impacto económico de la caza en España por subsectores.....	7
Tabla 3 Especies cinegéticas cuya carne es comercializable	13
Tabla 4 Número de capturas de caza mayor por especie animal en España. Años 2005 a 2013	14
Tabla 5 Valores típicos de pH para carnes normales, PSE y DFD.....	20
Tabla 6 Distribución, tipo de ciclo y hospedadores de las diferentes especies y genotipos del género <i>Trichinella</i>	29
Tabla 7 Clasificación y nomenclatura de las diferentes toxinas Shiga	38
Tabla 8 Análisis realizados en este estudio	69
Tabla 9 Composición del agua de peptona tamponada	70
Tabla 10 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida TEMPO® TVC.....	71
Tabla 11 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida TEMPO® EB	71

Tabla 12 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida TEMPO® TC	72
Tabla 13 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida TEMPO® EC	72
Tabla 14 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida TEMPO® STA	73
Tabla 15 Composición en g/l del caldo de cultivo selectivo SJI-CUADRADO® .	75
Tabla 16 Composición en g/l del medio de cultivo selectivo Hektoen	76
Tabla 17 Composición en g/l del medio de cultivo selectivo XLD.....	77
Tabla 18 Composición en g/l del medio de cultivo agar nutritivo	77
Tabla 19 Composición en g/l del medio de cultivo agar urea	78
Tabla 20 Composición en g/l del medio de cultivo agar TSI.....	79
Tabla 21 Composición de la solución salina de peptona.....	80
Tabla 22 Composición en g/l del medio de cultivo listo para su uso Agar Listeria según Otaviani y Agosti (ALOA).....	80
Tabla 23 Temperaturas y tiempos de incubación de los microorganismos indicadores de calidad microbiológica	89
Tabla 24 Variables dependientes cuantitativas	106
Tabla 25 Variables dependientes cualitativas	106
Tabla 26 Valores medios de microorganismos indicadores de calidad microbiológica en derivados de carne de caza y según la especie cinegética	113
Tabla 27 Combinaciones de genes que codifican factores de virulencia obtenidos entre las muestras presuntas positivas	123
Tabla 28 Valores medios de macronutrientes en derivados de carne de caza (% m – m)	124
Tabla 29 Contenido calórico medio según el tipo de derivado cárnico (kJ ó Kcal/100 g.)	130
Tabla 30 Resultado del test de distribución normal de Shapiro-Wilk.....	131

Tabla 31 Prueba t de Student para evaluar la diferencia en el recuento medio de enterobacterias y coliformes totales según el tipo de derivado cárnico (LOG ufc/g)	132
Tabla 32 Prueba U de Mann-Whitney para evaluar la diferencia del recuento medio de aerobios mesófilos totales, <i>E. coli</i> glucoronidasa positivo y estafilococos coagulasa positivos según el tipo de derivado cárnico (LOG ufc/g)	132
Tabla 33 Test X ² de Pearson para evaluar la asociación entre el tipo de derivado cárnico y la presencia de <i>Salmonella</i> spp.	133
Tabla 34 Test X ² de Pearson para evaluar la asociación entre la entre el tipo de derivado cárnico y los STEC presuntos positivos.....	134
Tabla 35 Test X ² para evaluar la asociación entre la presencia del gen O157 y el tipo de derivado cárnico.....	134
Tabla 36 Test X ² para evaluar la asociación entre la presencia del gen Stx 1/2 y el tipo de derivado cárnico.....	135
Tabla 37 Test X ² para evaluar la asociación entre la presencia del gen eae y el tipo de derivado cárnico	135
Tabla 38 Prueba t de Student para evaluar el contenido proteico medio según el tipo de derivado cárnico (% m – m).....	136
Tabla 39 Prueba U de Mann-Whitney para evaluar el contenido medio de agua, grasa total intramuscular y cenizas según el tipo de derivado cárnico (% m – m)	136
Tabla 40 Límites microbiológicos de higiene de los procesos.....	138
Tabla 41 Valores de referencia en contenido de macronutrientes en carne de cerdo y de cordero (g/100g)	139

3. RESUMEN.

RESUMEN.

INTRODUCCIÓN.

El objetivo fundamental de la caza ha ido variando a lo largo de los tiempos; desde la obtención de comida y materiales para herramientas y ropa en sus inicios, hasta su práctica sólo como actividad recreativa. Esta actividad se encuentra en auge en España y se estima que genera unos 3.600 millones de euros al año. Las especies de caza mayor más capturadas en España son el jabalí y el ciervo y uno de los productos secundarios que generan es la carne de caza. Esta carne es muy magra con muy poca grasa intramuscular. Las larvas de *Trichinella* spp. vehiculadas a través de la carne de jabalí y las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) de las que los rumiantes salvajes actúan como reservorio son los principales peligros biológicos asociados al consumo de carne de caza. El principal peligro abiótico que relacionado con la carne de caza es la transmisión alimentaria de plomo.

JUSTIFICACIÓN.

La seguridad alimentaria según la Organización para la Agricultura y la Alimentación “[...] *existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana.*”.

Esta definición pone de manifiesto que, además de accesibles, los alimentos deben ser inocuos y nutritivos, por lo que sería interesante ahondar en las condiciones higiénico-sanitarias y propiedades nutricionales de este tipo de carne.

HIPÓTESIS.

La importancia de la carne de caza desde un punto de vista económico y de sus características nutricionales y culinarias la hacen tener un valor cada vez más reconocido.

Por otra parte, su forma de obtención y los peligros que puede conllevar la hacen potencialmente insalubre.

La investigación de su ecología microbiana, así como el estudio de los riesgos establecidos en su obtención, transporte y manipulación con relación a los peligros bióticos es de singular importancia para prevenir posibles toxiinfecciones alimentarias.

Por otro lado y atendiendo a su valoración nutricional que, según la FAO, forma parte de su seguridad alimentaria sería de capital importancia para considerarla como un recurso de abastecimiento humano de macronutrientes.

OBJETIVOS.

Durante la realización de este trabajo nos hemos marcado los siguientes objetivos:

Determinar la calidad microbiológica de los derivados cárnicos de ciervo y jabalí mediante el recuento de microorganismos indicadores.

Investigar la presencia de microorganismos patógenos alimentarios en los derivados cárnicos de ciervo y jabalí.

Realizar un estudio nutricional del contenido en macronutrientes de los derivados cárnicos de ciervo y jabalí.

Comparar los valores microbiológicos obtenidos con los establecidos en la legislación vigente para las especies domésticas de abasto más próximas a las especies cinegéticas del estudio.

Comparar los valores nutricionales obtenidos con los publicados para las especies domésticas de abasto más próximas a las especies cinegéticas del estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se ha realizado un análisis microbiológico y nutricional sobre muestras congeladas de carne de ciervo y jabalí. El análisis microbiológico se ha dividido en el recuento de indicadores de calidad microbiológica e investigación y recuento de diferentes patógenos alimentarios. El recuento de indicadores de calidad microbiológica se ha realizado de forma automatizada mediante el sistema TEMPO®, basado en la técnica del número más probable. Los parámetros analizados han sido aerobios mesófilos totales, enterobacterias, coliformes totales, *E. coli* glucuronidasa positivos y estafilococos coagulasa positivos. Los patógenos alimentarios investigados han sido *Salmonella* spp. mediante técnicas inmunoenzimáticas y moleculares; STEC mediante técnicas moleculares y en el caso de *Listeria monocytogenes*, se realizó la técnica de recuento en placa y posterior investigación mediante técnicas moleculares.

Para realizar el análisis nutricional se ha determinado el contenido proteico mediante el método Kjeldahl, el contenido en grasa total intramuscular mediante el método Soxhlet con digestión ácida previa, el contenido en humedad tras desecación en estufa a 100 °C y el contenido en cenizas tras incineración en mufla a 550 °C, ambos mediante gravimetría.

El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el software estadístico Stata/IC v.12.1 para Windows® (32-bit). Hemos asumido un 95 % de significación estadística (p valor < 0,05).

RESULTADOS.

Se han analizado 90 muestras de derivados de carne de caza; 59 correspondientes a preparados cárnicos de ciervo y 31 a preparados cárnicos de jabalí.

Los recuentos medios de indicadores microbiológicos en ciervo y jabalí respectivamente son los siguientes (expresados en LOG ufc/g): aerobios mesófilos totales 7,2 y 7,1; enterobacterias 5,1 y 4,6; coliformes totales 4,9 y 4,4; *E. coli* glucuronidasa positivos 4,7 y 4,2 y estafilococos coagulasa positivos 2,2 y 1,6. La prevalencia de *Salmonella* spp. fue del 32,3 % en derivados cárnicos

de ciervo y 3,2 % en derivados cárnicos de jabalí. No se ha aislado *Listeria monocytogenes* en ninguna muestra. La prevalencia de presuntos positivos de STEC ha sido de 51,6 % en derivados cárnicos de ciervo y 6,5 % en derivados cárnicos de jabalí. Las diferencias de recuentos medios y prevalencias entre ambas especies son estadísticamente significativas excepto en los aerobios mesófilos totales.

En cuanto al análisis nutricional para los derivados cárnicos de ciervo y jabalí respectivamente ha sido de (expresado en % m-m): contenido proteico 21,2 y 20,8; contenido en grasa total intramuscular 0,3 y 1,2; contenido en humedad 76,5 y 73,1 y el contenido en cenizas 1,0 para ambos. Las diferencias en el análisis nutricional entre ambas especies son estadísticamente significativas excepto en el contenido en cenizas.

DISCUSIÓN.

El recuento de indicadores de calidad microbiológica, así como la prevalencia de *Salmonella* spp. entre los derivados cárnicos de ciervo son mayores que los resultados de otros autores. El resto de resultados microbiológicos se encuentran en consonancia con lo encontrado en la literatura científica.

De igual modo, los resultados del análisis nutricional concuerdan con lo publicado por diversos autores salvo el contenido de grasa total intramuscular, que es menor.

CONCLUSIONES.

- | | |
|---------|---|
| PRIMERA | Los derivados cárnicos de jabalí presentan mayor calidad microbiológica que los derivados cárnicos de ciervo. |
| SEGUNDA | La calidad higiénica de los derivados cárnicos de jabalí es mayor que la de los derivados cárnicos de ciervo. |
| TERCERA | La carne de ciervo tiene un papel importante como reservorio de STEC no-O157. |

- | | |
|---------|--|
| CUARTA | El riesgo de transmisión de STEC O157 mediante la carne de caza es bajo. |
| QUINTA | La carne de caza se podría utilizar en dietas para el control del sobrepeso debido a su bajo contenido graso. |
| SEXTA | Los derivados cárnicos de jabalí aportan más energía metabolizable que los derivados cárnicos de ciervo. |
| SÉPTIMA | Se deberían establecer criterios microbiológicos propios para la carne y derivados cárnicos de especies cinegéticas. |
| OCTAVA | La carne de las especies cinegéticas es más magra y menos grasa que la de las especies domésticas de abasto. |

ABSTRACT.

INTRODUCTION.

The main objective of hunting has varied over time; from obtaining food and materials for tools and clothing in the beginning, to practice only as a recreational activity. This activity is booming in Spain and is estimated to generate about 3,600 million € per year.

Wild boar and red deer are the most captured big game species and game meat is one of the by-products generated. Game meat is very lean with very little intramuscular fat. *Trichinella* spp. larvae conveyed through the meat of wild boar and strains of *E. coli* Shiga toxin-producing (STEC) of which act as wild ruminants are the main reservoir biological hazards associated with game meat consumption. Lead is the main abiotic hazard related with game meat.

JUSTIFICATION.

Food security, according to the Organization for Food and Agriculture "[...] *exists when all people, at all times, have physical, social and economic access to sufficient, safe and nutritious food to meet their daily energy needs and food preferences for an active and healthy life.* ".

This definition shows that besides affordable, food should be safe and nourishing, so it would be interesting to do research into the sanitary conditions and nutritional properties of this kind of meat.

HYPOTHESIS.

The game meat importance from an economic point of view and their nutritional and culinary characteristics make it have an increasingly recognized value.

Moreover, their method of production and the hazards that can lead to potentially make it unhealthy.

The research of its microbial ecology, as well as the study of the risks in their procurement, transport and handling with respect to biotic hazards is particularly important to prevent possible food poisoning.

On the other hand, and according to their nutritional value and to FAO, is part of their food security would be of paramount importance to consider it as a resource for human supply of macronutrients.

OBJECTIVES.

While performing this work we have set the following objectives:

To determine the microbiological quality of game meat from deer and wild boar by counting indicator microorganisms.

To investigate the occurrence of foodborne pathogens in game meat from deer and wild boar.

To conduct a nutritional survey of game meat from deer and wild boar.

To compare microbiological values obtained with those established in the legislation for domestic livestock related to game species of our study.

To compare the nutritional values obtained with those reported for domestic livestock related to game species of our study.

MATERIAL AND METHODS.

We performed microbiological and nutritional analyzes of frozen venison and boar samples. Microbiological analysis has been divided into the enumeration microbiological quality indicators and the research of different foodborne pathogens. Count microbiological quality indicators has been performed by automated TEMPO® system based on the most probable number technique. The parameters analyzed were total aerobic mesophilic bacteria, enterobacteria, coliforms, *E. coli* glucuronidase positive and coagulase positive staphylococci. The investigated foodborne pathogens are *Salmonella* spp. by immuno and molecular techniques; STEC by molecular and in case of *Listeria monocytogenes*, the research was performed using molecular techniques.

Nutritional analysis has been performed calculating crude protein content by Kjeldahl method, intramuscular total fat content by Soxhlet method with prior acid digestion, the moisture content by drying to a constant weight at 100 °C and ash content incinerating samples at 550 °C in a furnace.

Statistical analysis of data was performed with Stata / IC v.12.1 for Windows (32-bit) statistical software. 95% statistical significance was assumed (p value <0.05).

RESULTS.

We analyzed 90 game meat samples; 59 corresponding to deer meat and 31 wild boar meat.

The mean counts of microbiological indicators in deer and wild boar respectively are as follows (expressed as LOG cfu / g): Total aerobic mesophilic bacteria 7.2 and 7.1; enterobacteria 5.1 and 4.6; Total coliform 4.9 and 4.4; *E. coli* glucuronidase positive 4.7 and 4.2 and coagulase-positive staphylococci 2.2 and 1.6. *Salmonella* spp. prevalence was 32.3% in deer meat and 3.23% in wild boar meat. No *Listeria monocytogenes* has been isolated in any sample. Presumed positive STEC was 51.61% in deer meat and 6.45% in wild boar meat. The differences in mean counts and prevalence between the two species are statistically significant except for total aerobic mesophilic bacteria.

The nutritional survey results for deer and wild boar meat are respectively (expressed as% w-w) crude protein content 21.2 and 20.8; total intramuscular fat content 0.3 and 1.2; moisture content 76.5 and 73.1 and ash content 1.0 for both. Differences in nutritional analysis between the two species are statistically significant except for the ash content.

DISCUSSION.

Count microbiological quality indicators and the prevalence of *Salmonella* spp. among deer meat are higher than the results of other authors. The rest of microbiological results are consistent with findings in the scientific literature.

Similarly, the results of nutritional analysis are consistent with that published by various authors, although total intramuscular fat content is lower.

CONCLUSIONS.

- | | |
|---------|---|
| FIRST | Wild boar meat has higher microbiological quality than deer meat. |
| SECOND | Wild boar meat hygienic quality is greater than deer meat. |
| THIRD | Venison has an important role as a non-O157 STEC reservoir. |
| FOURTH | The risk of transmission of STEC O157 by game meat is low. |
| FIFTH | Game meat could be used in diets for weight control because of its low fat content. |
| SIXTH | Wild boar meat provides more energy than deer meat. |
| SEVENTH | Game meat and game meat products should have their own microbiological criteria. |
| EIGHTH | Game meat is more lean and less fatty than livestock meat. |

4. INTRODUCCIÓN.

La caza se define, según la Real Academia Española, como la acción de buscar o seguir a las aves, fieras y otras muchas clases de animales para cobrarlos o matarlos (1).

4.1 HISTORIA DE LA CAZA.

4.1.1 PREHISTORIA.

La caza ha representado una actividad indispensable para la supervivencia del ser humano a lo largo de su historia. El hombre, como una especie más que cohabita en el planeta, debe alimentarse y está incluido en la cadena trófica. Por lo tanto, se alimenta de algunas especies animales y otras pueden ser depredadoras suyas. De este modo la caza, además de suministrar pieles y materias primas para la realización de ropas, herramientas e incluso abalorios, ha sido la principal fuente de proteínas del ser humano.

A pesar de la controversia que suscita el tema, el consumo de carne por parte de los antepasados del hombre se cree que comenzó con el *Australopithecus africanus* (2). A pesar de haber encontrado restos del *A. africanus* junto a restos de animales, el punto débil de la teoría era la falta de herramientas de origen lítico. Blumenschine arguyó la posibilidad de utilizar los restos óseos de los animales como herramientas arcaicas (3). Sin embargo, estos antepasados del hombre eran más carroñeros que cazadores propiamente dichos. Esto se deduce del análisis minucioso de los huesos aparecidos en yacimientos del Paleolítico Inferior, que presentan marcas dejadas por los dientes de grandes carnívoros por debajo de las estrías provocadas por los utensilios de piedra para separar las piezas cárnicas por los homínidos. Esto prueba que muchos de ellos fueron abatidos y consumidos en primera instancia por depredadores no humanos. En base a estos hallazgos se piensa que el *Homo habilis* y el *Homo erectus* eran básicamente carroñeros, teniendo una escasa actividad cinegética (4).

En el último tramo del Paleolítico Inferior, el *Homo antecesor* comienza a tener una actividad cinegética más elevada, lo cual se demostró mediante hallazgo de esqueletos encontrados tras el despiece in situ de gamos por los pobladores de

Gesher Benot Ya'kov en Israel, hace aproximadamente 780.000 años (5). Esos homínidos mataban regularmente piezas de lo que hoy se considera caza mayor para alimentarse. Encontramos más ejemplos de actividad cinegética en Inglaterra, más concretamente en Boxgrove. Una escápula de un caballo con una perforación semicircular nos proporciona una prueba consistente de caza con lanza hace aproximadamente 500.000 años (6). Estas puntas de lanza de piedra parecen ser comunes en la Edad de Piedra y el Paleolítico Medio en yacimientos de Europa y África (7). Otro hallazgo de restos óseos atribuidos a *Ovis ammon antiqua* (Argalí) nos indican que hace 440.000 años el hombre ya cazaba ovinos silvestres en Europa (8).

En la Península Ibérica la primera actividad cinegética de la que se tiene constancia, se confirmó mediante el yacimiento de Áridos, en Arganda del Rey, Madrid. En las excavaciones se encontraron restos de un solo elefante, prácticamente completo. Junto a estos huesos aparecieron unas trescientas piezas de pedernal correspondientes a útiles para descarnar y los fragmentos sobrantes resultado de su fabricación. Del análisis de los restos encontrados, se supone que un grupo humano que portaba pedernal recogido a algunos kilómetros de allí, se instaló en una llanura abierta en las proximidades de un elefante muerto, el cual consumieron para lo cual prepararon los útiles in situ, a partir del material lítico transportado (4).

Ya en el Paleolítico Medio, el *Homo sapiens neanderthalensis* comienza a practicar una caza poco especializada puesto que no disponía todavía de las técnicas de propulsores o arcos, desarrolladas posteriormente en el Paleolítico Superior. Prueba de ello, es que en el yacimiento de la cueva del Castillo, en Cantabria, se hallaron restos de 78 ciervos, 58 bóvidos y 35 caballos. Incluso se hallaron restos de rinoceronte de Merck (9).

En el arte rupestre del Paleolítico Superior encontramos testimonio de las piezas que se abatían, fundamentalmente mamíferos ungulados de gran tamaño, lo que hoy se correspondería con caza mayor. Prueba de ello son los restos óseos de una serie de yacimientos magdalenienses en la cornisa cantábrica en los que predominan los restos de ciervo, cabra montés y sarrio y en menor proporción jabalí, caballo y corzo (9). El ser humano seleccionaba

presas de gran tamaño por dos motivos; el primero es que no era capaz de fabricar armas que fuesen suficientemente precisas como para dar en el blanco de presas pequeñas y el segundo es que, debido a que se practicaba una caza cooperativa, el animal o los animales capturados debían ser grandes para poder compartirlos.

Desde que la agricultura y la domesticación de algunas especies, incluso de interés cinegético hasta entonces, se van implantando en el día a día del ser humano, aproximadamente en el año 9000 a. de C. en Oriente Medio (10), la caza va perdiendo su papel como fuente de recursos alimenticios. A partir de ese momento, la caza va adquiriendo una nueva dimensión: el trofeo resultante de una cacería. En aquel contexto, la exhibición de trofeos podría favorecer que una hembra los eligiese como progenitor de su descendencia, en virtud de las habilidades cinegéticas demostradas y supuestamente heredables. Esta costumbre de adornarse con trofeos de caza es un comportamiento muy extendido en pueblos primitivos actuales (11).

4.1.2. EDAD ANTIGUA.

En tiempos de la Grecia Clásica, la caza era una actividad reservada únicamente a dioses y héroes. Ha quedado reflejado en la pintura y musivaria helenas con representaciones de escenas de caza de los propietarios griegos junto a las principescas de Asia (12). Este repertorio incluye escenas de cacerías de leones y ciervos, como se ve en los conocidos mosaicos de guijarros de Pella, del siglo IV a. de C.

La caza durante la época romana quedó reflejada en innumerables mosaicos y elementos decorativos como los conservados en el Museo de Arte Romano de Mérida, procedentes de la villa romana de El Hinojal (13). En uno de ellos se representa a un cazador clavando la lanza a un jabalí que se abalanza contra él. En el otro, es un cazador a caballo lanceando a una pantera en un paisaje con árboles y plantas. Durante la fase inicial del Imperio Romano, la caza no gozaba de la popularidad que alcanzó tras la influencia griega. Al principio se la consideró algo demasiado frívolo puesto que no ocupaba ni cuerpo ni mente. En

esta fase únicamente la practicaban esclavos o siervos con el doble motivo de proveer de alimentos al señor y protegerlo de las bestias salvajes.

Este período será el último en el que la caza podrá ser practicada libremente por cualquier ciudadano sin importar la propiedad del terreno en el que se cace, ya que las piezas de caza no se consideraban propiedad de nadie, *rex nullius*, únicamente del que las cazaba.

A lo largo de la historia de España, denominada por los romanos Hispania, que tomaron del nombre fenicio de *I-spn-ya* en relación con la gran población de conejos que observaron (14), la caza ha tenido una gran importancia también a lo largo de la Edad Media.

4.1.3. EDAD MEDIA.

En este período es cuando la caza adquiere un dueño, casi siempre representado por los señores feudales o el mismísimo Rey. La propiedad de cazaderos y la participación en acciones cinegéticas aumentaba el prestigio social del dueño, incluso de la figura encargada de la organización y logística venatoria, denominada montero mayor (11).

La gestión de esos cazaderos no era necesaria puesto que se trataba de terrenos muy extensos con una riqueza cinegética prácticamente inagotable. Este hecho mantuvo protegidos de la deforestación y la agricultura muchos cazaderos hasta nuestros días con una gran diversidad biológica, como puede ser el monte de El Pardo, en Madrid.

Se pueden distinguir tres finalidades diferentes a la caza durante la Edad Media. La primera es la de contribuir a la alimentación de los ejércitos, en constante movimiento, durante la Reconquista. La segunda es el control de alimañas y animales salvajes mediante partidas comunales organizadas y dirigidas por los señores feudales. La tercera es la de abastecer en parte las necesidades de campesinos, conventos e incluso algún palacio.

Como hemos visto, durante la Edad Media se estamentó la caza; la modalidad de caza menor era practicada por campesinos y monjes y tenía un

cariz absolutamente económico, tanto por complementar la alimentación, como por obtener recursos económicos de su venta (15). Por otra parte, la modalidad de caza mayor era practicada por reyes y señores. Debido a la complejidad y peligros que encierra, sirvió a éstos no solo de entretenimiento, sino de adiestramiento y preparación física, como expone Alfonso XI en el Libro de la Montería (16), que es el primer gran libro del arte de la caza.

4.1.4. RENACIMIENTO E ILUSTRACIÓN.

Esta implantación de la caza hacia las clases nobles de la sociedad fue favorecida en España gracias a las disposiciones legales iniciadas en el siglo XVIII. Estas esgrimían desde razones de seguridad ciudadana, hasta exaltaciones abiertas de los valores aristocráticos de la caza, razones de índole económica y hasta criterios de conservación cinegética, como demuestran el texto enviado en 1757 al Intendente de Palencia por Manuel de Heredia y Torres, de la Junta de Obras y Bosques, quejándose de la falta de respeto por la legislación de caza: *“...Que es tan general este vicio en la Provincia que ya puede estimarse en menos la aniquilación de la Caza, respecto de la olgazanería y daño que resulta a los Pueblos, pues el Zirujano, Barbero, Sastre, Zapatero, Herrero, y otros oficios dejando de trabajar en ellos pierden la manutención de sus familias, hacen falta a lo necesario, y de olgazanes pasan a Ladrones, subiendo la insolencia a tal grado que hasta los Carniceros Mesoneros y otras gentes vajas usan de la diversión de la Caza, y la destrozan con libertad...”*. En Calahorra, en 1754, se repetían los argumentos al tomar ciertas medidas legales: *“...también para que los oficiales, y personas humildes, y atareadas a las fatigas de su respectivo oficio para su sustento, no pudiesen salir a cazar [...] porque aficionados desmedidamente aquéllos a dicha Caza no sólo la extinguen sino que perjudican a sus mismas Casas y caudales, faltando al cuidado y manejo de ellos y a las tareas y oficios que se los han de aumentar, sustentar sus familias, permitirles únicamente a éstos el que los días feriados después de los divinos oficios puedan salir a cazar y divertirse con escopeta...”* (17).

4.1.5. SIGLO XX HASTA NUESTROS DÍAS.

En el siglo XX, el Duque de Almazán, enumera los cotos que existieron en España hasta el 15 de febrero de 1931, que hacen un total de 45, acompañados siempre de sus nombres y titulares, ordenados en 7 regiones cinegéticas que son Montes de Toledo, Sierras de Extremadura, Andalucía Manchega, Sierra Morena en Andújar, Sierra Morena en la parte de Hornachuelos, Cotos del Sur de España y Cazaderos de monteses (18). De esta relación se dice que únicamente se refiere a aquellos cotos que había visitado el autor (19).

El Conde de Yebes en su libro Veinte Años de Caza Mayor, establece una ordenación geográfica de las diferentes zonas de España, y se adelanta a lo que vendrá en un futuro, exaltando las ventajas que la caza aporta a la población rural, augurando un buen porvenir al turismo cinegético en España (20).

Ese augurio acertó de pleno. Se estima que entre un 20 y un 30% de los cazadores residentes en la Unión Europea (UE) cazan, al menos ocasionalmente en el extranjero (21). Y España se constituye en inmejorable destino, por proximidad geográfica a uno de los principales emisores de cazadores (UE), variedad de especies cinegéticas y calidad de las mismas (22). Esta calidad no sólo se debe al aumento del número de trofeos homologados como se puede apreciar en la Tabla 1, sino también en las puntuaciones de esos trofeos; por ejemplo, el récord absoluto de venado tenía una puntuación de 208,53 en 1958 y en el año 2000 alcanzó los 219,81 puntos (22).

**Tabla 1 Evolución del número de trofeos homologados en España.
Quinquenios 1971 – 1975 y 1996 – 2000**

Especies	1971 – 1975	1996 – 2000
Ciervo	972	4.425
Jabalí	1.479	2.264
Gamo	173	905
Corzo	491	1.219
Muflón	110	1.218
Cabra montés	444	651
Rebeco pirenaico o Sarrio	428	746

**Tabla 1 Evolución del número de trofeos homologados en España.
Quinquenios 1971 – 1975 y 1996 – 2000**

Especies	1971 – 1975	1996 – 2000
Arruí	0	61
Rebeco cantábrico	257	147

Fuente: Junta Nacional de Homologación de Trofeos de Caza (2002)

4.2. IMPACTO ECONÓMICO DE LA CAZA.

La caza se está convirtiendo en una actividad más del medio rural, llegando a convertirse incluso en alternativa a las actividades agrícolas, ganaderas o forestales (23).

Si analizamos la caza como actividad económica, encontraremos un gran número de intervinientes implicados en ella. En la Tabla 2 se resume el impacto económico de la caza en España en un estudio del año 2012 (24).

Tabla 2 Impacto económico de la caza en España por subsectores

Subsector	Euros generados
Flujo por capturas caza mayor	303.359.650
Flujo por capturas caza menor	741.000.000
Gastos veterinarios	4.867.530
Taxidermia	42.260.000
Rehalas	75.900.000
Armas y cartuchería	162.698.000
Armería y complementos	36.001.000
Perros utilizados para la caza	408.000.000
Gastos tenencia de armas y licencias federativas	27.178.066
Licencias de caza y seguros de responsabilidad civil	50.396.750
Seguros de responsabilidad civil de cotos	41.250.000
Arrendamiento de cotos	525.000.000
Planes de ordenación	11.200.000
Guarderías	336.000.000
Medios de comunicación	19.742.000

Tabla 2 Impacto económico de la caza en España por subsectores

Subsector	Euros generados
Sector de restauración y hotelero	142.024.000
Sector transporte ^(a)	664.000.000
Gestión de cotos	44.880.000
Total	3.635.756.996

(a): está incluido el gasto de combustible

La caza, además de generar en España alrededor de 3.600 millones de euros, crea 36.258 empleos directos (25). El número de trabajadores eventuales se calculan en unos 20.000 más al año (24), así que podemos decir que la caza genera 56.000 puestos de trabajo al año en España.

Según los datos recogidos en las estadísticas del Ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (en adelante MAGRAMA) correspondientes al año 2011, la superficie correspondiente a terrenos cinegéticos, 40.690.024 ha. corresponde con un 80 % de la superficie total de España (26).

4.3. TIPOS DE CAZA, MODALIDADES Y ANIMALES DE INTERÉS CINEGÉTICO.

Tradicionalmente la caza se ha dividido fundamentalmente en dos tipos: caza mayor y caza menor. Esta clasificación viene regulada por la Ley de Caza de 1970 (27). La diferencia fundamental radica en el tamaño de las presas cobradas en una y otra.

A continuación describiremos brevemente en qué consiste cada una de ellas y las modalidades que abarca (28).

4.3.1. CAZA MAYOR.

Se caracteriza por el mayor tamaño de las piezas cobradas. Se clasifica en base a ésta característica, y no por la forma o modalidad de la cacería. Las diferentes modalidades de practicar la caza mayor son:

Montería.

Es la más clásica y tradicional modalidad de caza mayor en España. En un monte o mancha de varios cientos de hectáreas, se disponen una serie de armadas. Según su ubicación en la mancha, reciben diferentes nombres:

- Cuerda: Es la armada más alta.
- Sopié: La armada más baja.
- Traviesa: La armada que atraviesa o se encuentra en medio de la mancha.

El funcionamiento de ésta modalidad de caza es que desde un extremo determinado, o desde más de uno, se procede a la suelta de rehalas, que conducidas por los perreros, batirán la mancha o el monte con el fin último de que las piezas de caza durante su huida atraviesen las armadas o puedan ser avistados por los monteros.

Es una modalidad de caza que, además de exigir una acción muy planificada, exige del cazador máxima atención, silencio y puntería sobre blanco móvil. Se caracteriza porque a las presas se les ofrece una gran posibilidad de escapatoria.

Rececho y aguardo.

Constituyen probablemente una de las modalidades de caza mayor en la que el cazador se integra más en el entorno natural. Al contrario que en la modalidad anterior, se requiere de una acción individual en la que, tras localizar y aproximarse a los animales, se trata de realizar el disparo en las mejores condiciones una vez que se ha valorado el animal a abatir.

Con la excepción del jabalí, el cual se caza generalmente en las modalidades de montería o espera, todas las especies de caza mayor españolas son susceptibles de ser cazadas en la modalidad de rececho.

Batida.

Aunque la primera impresión nos pudiese sugerir que una batida es una montería pero con otra denominación, hay algunas diferencias que la caracterizan como una modalidad distinta, las cuales son:

- Puede realizarse con o sin perros, a diferencia de la montería, donde la utilización de rehalas es esencial.
- El terreno suele batirse en una sola dirección y hacia una sola armada de cazadores.
- El tamaño del terreno suele ser menor, así como el número armas o tiradores.
- La acción de los perros es sustituida por personas que, gritando y haciendo ruido, tratan de conducir la huida de los animales hacia la línea de cazadores.

El gancho.

Es una modalidad de caza muy popular en España, puede ser denominado como una pequeña batida practicada por unos pocos cazadores con un escaso número de perros o sin ellos.

Espera.

También denominada aguardo, es junto a la montería la modalidad más practicada para cazar el jabalí en España. El modo de actuar es que el cazador esperará a una distancia prudente, oculto y siempre teniendo en cuenta la dirección del viento, tras haber comprobado las querencias, pasos fijos, lugares de alimento, bebida o baño. Esta modalidad exige al cazador gran paciencia y silencio, ya que suele ser nocturna y solitaria.

4.3.2. CAZA MENOR.

Al igual que la caza mayor, está definida por el tamaño de los animales a capturar y por la modalidad utilizada por el cazador. Se enumeran a continuación las principales modalidades.

Caza en mano.

Es aquella practicada por varios cazadores conjuntamente, abiertos en ala y a una distancia equidistante, generalmente ayudados por perros, con el objeto de batir el campo. Cada mano se compone comúnmente de una partida de entre dos y seis cazadores. Es una modalidad muy popular y generalizada que se practica para las diferentes especies de caza menor y que engloba los alicientes de tratarse de una caza en equipo con perro, la cual requiere de un cierto esfuerzo físico.

Caza al ojeo.

Es una de las modalidades tradicionales de la caza menor española, practicada habitualmente sobre la perdiz roja (*Alectoris rufa*, Linnaeus 1758), que es la especie más representativa de la caza menor en España. Sobre un terreno predeterminado se colocan los puestos o pantallas (alrededor de una docena) en disposición semicircular (puede haber variaciones debido a la disposición del terreno). Los ojeadores o batidores (de dos a tres por escopeta) se colocan en dirección opuesta a la de los puestos y también en semicírculo. Avanzan hacia los puestos haciendo ruido con el objeto de dirigir la huida de las perdices hacia los puestos. Se debe prestar especial atención a la hora de realizar el ojeo para evitar que las perdices se amontonen, ya que, al arrancar el vuelo en grupos, resultarían en un pobre aprovechamiento cinegético al tirador. El objetivo es que las perdices rompan a volar de manera natural y sobre todo de una forma gradual, progresiva y continua, permitiendo mayores oportunidades de disparo.

Al salto con perro.

La caza al salto, con o sin perro, es probablemente una de las modalidades más duras y más practicadas por los cazadores españoles. El cazador en

solitario avanza por el terreno levantando las piezas y, gracias a una serie de factores como son, su experiencia sobre el terreno, el conocimiento de las reacciones de las diferentes especies cinegéticas y una buena preparación física, poder llevar a cabo una buena cacería. Es por definición la caza al salto con perro la modalidad reina de las diferentes disciplinas cinegéticas, la cual es objeto de competiciones deportivas de alto nivel.

Caza con reclamo.

En esta modalidad de caza en la que el reclamo suele ser una perdiz macho enjaulado, atraerá a sus congéneres salvajes durante el período del celo hasta entrar en plaza, aproximadamente a unos quince metros del puesto del cazador. La jaula con el reclamo ha de colocarse sobre una piedra o arbusto ligeramente elevado llamado “pulpitillo”. El elemento más importante de esta forma tradicional de caza no radica en el lance final y el disparo, sino en el comportamiento del reclamo.

En la caza con cimbel, el señuelo utilizado es de paloma torcaz y puede ser una paloma torcaz viva o una silueta y se pretende imitar las costumbres que tienen las torcaces cuando se quieren posar en los árboles para descansar, cuando están comiendo en el suelo o en el desplazamiento del árbol al suelo (29).

Al paso.

En esta modalidad, especialmente ejercitada para la caza de palomas, tórtolas, zorzaes y aves acuáticas, los cazadores esperarán ocultos y perfectamente camuflados para no ser descubiertos. Es esencial este aspecto debido a que los puestos de caza se establecen en zonas de paso natural o querencioso de las aves mencionadas en sus distintas trayectorias hacia las zonas de alimentación, bebida o dormidero.

4.3.3. ANIMALES DE INTERÉS CINEGÉTICO.

Según el art. 4.3 de la ley 1/1970 (27) y modificada por el Anexo I del Real Decreto (en adelante RD) 1095/1989 (30) se definen los animales que corresponden a la denominación de caza mayor y menor. A partir de esa clasificación, el RD 1118/1989, en su Anexo I, especifica aquellos cuya carne se puede comercializar. La Tabla 3 resume las especies cinegéticas, diferenciando entre caza mayor y menor, cuya carne es comercializable (31).

Tabla 3 Especies cinegéticas cuya carne es comercializable

	Caza mayor	Caza menor
Mamíferos	Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	
	Ciervo (<i>Cervus elaphus</i>)	
	Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	
	Rebeco (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	Liebre (<i>Lepus</i> spp.)
	Gamo (<i>Dama dama</i>)	Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
	Cabra montés (<i>Capra pyrenaica</i>) excepto Bucardo	Zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)
	Muflón (<i>Ovis musimon</i>)	
	Arruí (<i>Ammotragus lervia</i>)	
Aves		Ánade real (<i>Anas platyrhynchos</i>)
		Perdiz roja (<i>Alectoris rufa</i>)
		Perdiz moruna (<i>Alectoris barbara</i>)
		Faisán (<i>Phasianus colchicus</i>)
		Paloma torcaz (<i>Columba palumbus</i>)
		Paloma zurita (<i>Columba oenas</i>)
		Codorniz (<i>Coturnix coturnix</i>)

Las especies sobre las que hemos desarrollado el presente estudio han sido el ciervo y el jabalí, ya que como se puede apreciar en la Tabla 4 de la página siguiente, donde podemos ver la evolución del número de capturas desde el año 2005 hasta el año 2013 (26), son estas dos especies cinegéticas las más capturadas en España.

Tabla 4 Número de capturas de caza mayor por especie animal en España. Años 2005 a 2013

Especie	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Ciervo	78.449	68.138	102.350	78.008	93.152	104.694	148.195	138.665	139.452
Jabalí	143.189	149.221	160.422	115.950	136.356	161.601	209.357	222.692	290.844
Corzo	14.073	19.421	16.645	12.951	20.858	16.355	31.155	36.628	41.925
Gamo	6.429	5.766	8.722	7.833	9.662	11.234	17.456	15.175	16.268
Cabra montés	2.111	2.192	1.944	1.304	1.632	3.017	3.962	5.547	6.805
Rebeco	1.440	1.116	976	888	602	1.067	866	1.334	1.352
Muflón	3.703	3.574	6.278	5.003	6.278	8.089	9.868	10.446	10.779
Arruí	368	231	388	412	531	777	586	980	517

Elaboración: Propia

Fuente: Anuarios de Estadística Forestal. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Ciervo (*Cervus elaphus*, Linnaeus 1758).

También denominado ciervo europeo, ciervo rojo o venado, es una especie de cérvido de distribución mayoritaria por el Hemisferio Norte. Es el segundo cérvido más grande, superado sólo por el alce. Es la especie de mayor valor cinegético y es por eso que se ha introducido en varios países del Hemisferio Sur tales como Nueva Zelanda, Australia o Argentina.

Presenta una longitud de 160 a 250 cm. y un peso que en los machos puede llegar a los 200 kg. Como casi todas las especies cinegéticas, presenta un marcado dimorfismo sexual, siendo las hembras más pequeñas y generalmente sin cuernos, aunque algunas presenten pequeñas cuernas. Los machos poseen una impresionante cornamenta que renuevan cada año, y que es la principal causa del alto valor cinegético de esta especie. Ésta puede indicar el estrés sufrido durante su desarrollo anual, lo que podría reflejarse en la asimetría entre éstas (32). Incluso hay estudios como el de Malo y Suárez (33), en el que el tamaño relativo y la complejidad de las cuernas se relaciona con el tamaño relativo y la velocidad de los espermatozoides. Por lo tanto, las cuernas además de indicar la potencial capacidad de lucha pueden indicar su fertilidad. El color del pelo suele ser pardo en todo el cuerpo, salvo en el vientre y los glúteos. Los

machos de algunas subespecies pueden tener una melena de pelo oscuro en el cuello y los hombros. La subespecie hispánica (*Cervus elaphus hispanicus* Hilzheimer 1909) difiere en su menor talla que la subespecie nominal, coloración más grisácea y cráneo más pequeño (34).

La dieta es mixta, entre el pastoreo y el ramoneo; en el invierno y sobre todo en primavera se compone de herbáceas (hasta un 75 %) y va aumentando el uso de leñosas y frutos forestales en verano y otoño (35). La actividad de alimentación tiene lugar principalmente tanto al amanecer como en el ocaso, dejando las horas centrales del día para descanso (36).

El ciervo es un animal social y forma grupos en función de su sexo; las hembras viven en manadas grandes con los cervatillos y los machos se mueven o bien de forma solitaria o en grupos pequeños de unos cinco individuos. Estos grupos sólo se acercan a los grupos de hembras en la época de celo, que discurre en los meses de agosto y septiembre (marzo y abril en el caso del Hemisferio Sur). Es una época del año en el que los machos están en su máximo desarrollo ya que comienza lo que se conoce en España como berrea, que corresponde al sonido (37) que emiten durante este período para llamar la atención de las hembras. Hay estudios que indican que la tasa de berridos por unidad de tiempo que emite un macho está relacionada con su capacidad de ganar en una pelea, por lo que puede servir para decidir retar o no al macho dominante (38).

La subespecie ibérica (*Cervus elaphus hispanicus* Hilzheimer, 1909) se encuentra bien diferenciada las 22 subespecies que se distribuyen por el resto del mundo (39) y no se tiene constancia de que haya sido exportada o introducida en alguna parte del mundo. El número de subespecies de *Cervus elaphus* es motivo de controversia entre Geist y (40), ya que en este último estudio se concluyó que había una gran probabilidad de que existiesen dos especies diferentes de ciervo; una con tres subespecies en Asia y América, y la otra con cuatro subespecies en Eurasia y una o dos subespecies fundamentales en Asia Central. En cualquier caso, la presencia de animales del género *Cervus* en la Península Ibérica se inició hace millones de años y existe registro fósil de *Cervus elaphus* desde al menos el Pleistoceno superior, hace unos 120.000 años (41).

El ciervo ocupa la mayor parte de los hábitats de la Península Ibérica que dispongan de praderas junto a cobertura arbórea, al menos como refugio; concretamente, se distribuye por todo el territorio peninsular a excepción de la zona más occidental de Galicia y la costa de Levante (42). A pesar de la gran ocupación del territorio español, las poblaciones actuales de ciervo se encuentran fragmentadas en subpoblaciones que oscilan entre la centena y el millar de ejemplares, debido a múltiples causas, principalmente las infraestructuras y la gestión cinegética de territorios (43). Este aislamiento provoca efectos genéticos no deseables, como menor calidad de los trofeos en aquellas zonas con menor variabilidad genética (44).

La importancia del ciervo, desde el punto de vista de la Salud Pública, radica principalmente y al igual que otros rumiantes salvajes, en su papel como reservorio y vector de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) (45).

Jabalí (*Sus scrofa*, Linnaeus 1758).

Es un mamífero de tamaño mediano con un dimorfismo sexual no muy marcado, únicamente apreciable por el mayor tamaño del macho, el cráneo más largo y la presencia de caninos de un tamaño considerable. Podemos destacar el mayor desarrollo del tren delantero en contraposición al cerdo (*Sus scrofa domestica* Linnaeus, 1758), el cual tiene más desarrollado el tren posterior debido a la selección genética.

La longitud media de cabeza y cuerpo varía en machos entre 1.176 mm. y 1.446 mm. y entre 1.132 mm. y 1.391 mm. en hembras (46,47). En cuanto al peso, oscila entre los 43 kg. y los 85 kg. de media en machos adultos y entre 50 kg. y 70 kg. en el caso de hembras adultas (48,49). El pelaje varía con la edad; desde el nacimiento hasta los seis meses de edad aproximadamente, presentan la típica coloración a rayas que tiene por objeto mimetizar al animal en el entorno y que ha servido para otorgarles el nombre de rayones. Una vez que pierden esta coloración y hasta el año de vida, la capa toma un color entre rojizo y pardo, motivo por el cual se les denomina bermejós. A partir del año de vida, el color del pelo se oscurece y aparecen las primeras canas, fundamentalmente en cabeza y flancos.

Para determinar la edad se pueden utilizar varios métodos. El más utilizado a nivel de campo es usando la evolución dentaria. Este método es válido hasta que el jabalí alcanza 30 meses, momento en el cual se ha completado la fórmula dentaria del animal adulto (46). Hay que tener en cuenta además, que los colmillos del jabalí crecen durante toda la vida del animal, a un ritmo de unos 3 mm. al año (50).

El jabalí tiene una gran adaptabilidad a una gran variedad de hábitats, desde la desembocadura de algunos ríos hasta las alturas de los Pirineos o Sierra Nevada pasando por bosques de repoblación, bosques húmedos de cornisa cantábrica y gallega hasta los alrededores de ciudades como Madrid y Barcelona (48).

Debido a su carácter omnívoro, consigue explotar de manera muy eficiente los recursos naturales y, también, las fuentes de alimentación que tienen origen humano, como por ejemplo las poblaciones de jabalíes asentadas en los campos de maíz de algunas de las cuencas hidrográficas de nuestro país (48). Para acceder a parte del alimento vegetal, los jabalíes hozan en busca de tubérculos y raíces, y esta actividad alcanza su máximo durante el invierno, mientras que es durante el verano cuando se reduce al mínimo dicha actividad (51).

Tras analizar el contenido estomacal en diferentes zonas de España se ha encontrado desde contenido vegetal (rizomas de castañuela, bellotas de encina, etc.) a restos de aves y mamíferos (roedores, conejo, zorro, etc.) pasando por insectos o cangrejo americano (*Procambarus clarkii* Girard, 1852) (52–55).

Debido a su adaptación al medio, el jabalí es una especie en la que la ovulación está íntimamente ligada a la adquisición de una buena condición física de las hembras (56). Por ello, la época de celo varía según las condiciones de cada ecosistema, pudiendo llegar a variar de un año a otro. En condiciones normales, el periodo de celo más importante es el transcurre entre los últimos días de octubre y los primeros de noviembre, aunque en zonas más frías como puede ser la provincia de Álava, estas fechas se adelantan al mes de septiembre (57). De hecho, una alimentación suplementada puede provocar el mismo efecto (56). Es de ese modo como se consiguen 2,1 partos/cerda/año en una raza tan

próxima al jabalí como es el cerdo ibérico (58). El tamaño medio por camada oscila entre los 3,3 rayones en el Pirineo occidental aragonés y los 4,5 del Parque Nacional de Doñana (48). Ello es debido a la estrategia reproductiva del jabalí, llevada hasta el extremo de que puede llegar a adelantar el alumbramiento debido a la presión cinegética (59). Los nacimientos se llevan a cabo en parideras construidas por las madres, mediante la acumulación de ramas de los alrededores, haciendo éstas función de paredes y techo, siendo el lecho preparado a base de ramitas masticadas.

Los jabalíes están organizados en grupos matriarcales, liderados por una hembra adulta y con gran experiencia, a la que siguen otras hembras junto con las crías de la camada de ese año y hembras subadultas nacidas la temporada anterior. En la periferia de los grupos se encuentran los machos adultos. Durante la época de partos, los grupos son más numerosos y el momento del año en el que éstos son menos numerosos es durante la época de celo (60). No debería resultar extraño que en una especie tan social como el jabalí, el uso de la comunicación sonora ocupe un lugar prioritario. (61) Llegaron a registrar 106 sonidos diferentes en los rayones para comunicarse con su madre y sus hermanos. Este sistema de comunicación es tan preciso que puede ocasionar ataques de la madre cuando escuche el sonido correspondiente (62).

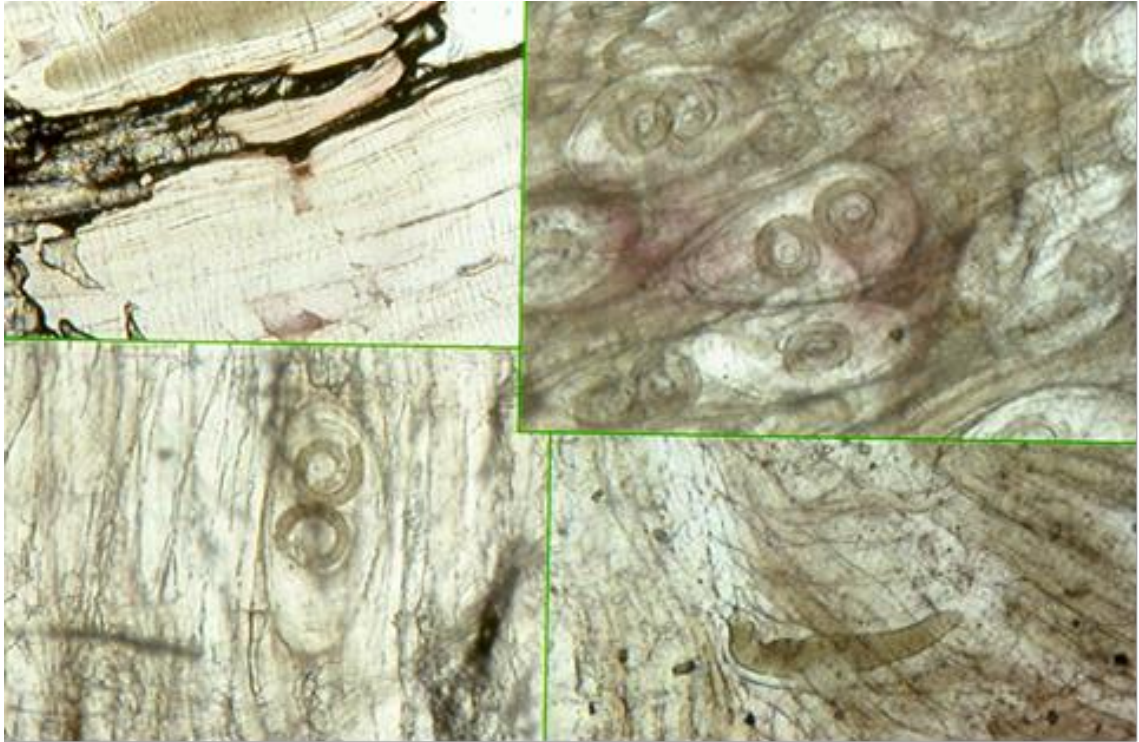


Foto del autor.

Figura 1 Quistes de triquina en jabalí

Desde el punto de vista de la Salud Pública, la importancia del jabalí reside en su papel fundamental como vector de la triquinosis junto con el cerdo doméstico (63).

4.4 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA CARNE DE CAZA.

El cambio histórico de la caza hace que hoy en día, además de practicarla como actividad recreativa con la recompensa de un trofeo, se produzca un placer al comer este tipo de alimento, lo cual para muchos cazadores es un valor añadido. El consumidor de carne de ciervo le atribuye aroma, sabor, jugosidad y ternura (64).

Un trabajo de Wiklund *et al.* (65) demostró que tras un panel de cata, se podía distinguir entre la carne de ciervos alimentados de forma natural de la carne de ciervos estabulados alimentados a base de piensos.

Los consumidores cada vez quieren conocer más sobre la calidad, valor nutricional y salubridad de los productos cárnicos que adquieren, y eso, como no podía ser de otra manera, afecta a la carne de caza (66,67).

En cuanto a la calidad de la carne en general, las dos alteraciones fundamentales que podemos encontrar son las carnes pálidas, blandas y exudativas (*Pale, Soft and Exudative*; PSE) y las carnes duras, oscuras y secas (*Dark, Firm and Dry*; DFD) (68). Estos defectos de calidad se describen mediante la comparación del pH de las carnes defectuosas con carnes normales tal y como se refleja en la Tabla 5 (69–71). Esos valores no son exactos, admitiéndose tolerancias en torno a esos valores.

Tabla 5 Valores típicos de pH para carnes normales, PSE y DFD

Tipo de carne	pH tras 45 minutos	pH final
PSE	Menor de 6.0	5.3
Normal	6.4	5.3
DFD	6.4	Mayor de 6.0

La acidificación de las canales sucede debido a la transformación del glucógeno muscular en ácido láctico debido a las condiciones de anaerobiosis.

Estos defectos de calidad pueden ocurrir en cualquier especie dependiendo de cómo sea el manejo de los animales previo al sacrificio. Ello es debido a que ambas alteraciones están directamente relacionadas con el estrés ante-mortem. La diferencia entre una y otra reside en su duración y el momento en el que se produce.

En el de las carnes PSE, el estrés se produce en el momento inmediatamente anterior al sacrificio y puede estar provocado por peleas en la manga de manejo que los lleva hasta la sala de aturdimiento y degüello o el uso de azuzadores eléctricos para manejar a los animales (68).

Ese estrés inmediato e intenso provoca la movilización de las reservas energéticas del animal (72), provocando una tasa de acidificación más rápida de lo normal alcanzando valores de pH más bajos mientras la temperatura de la canal no ha disminuido lo suficiente.

Esta combinación de pH y temperatura provoca la desnaturalización de las proteínas del músculo que pierden la capacidad de retener agua. Cuando se filetea la carne se produce una gran cantidad de exudado, algo que se considera característico de las carnes PSE (69).

Si el estrés sufrido por el animal, en lugar de ser próximo al sacrificio y muy intenso es mucho más prolongado en el tiempo durante el día anterior al momento del sacrificio, nos podemos encontrar con carnes DFD.

Situaciones que favorecen este tipo de alteraciones de la calidad de la carne pueden ser el transporte de los animales a gran distancia, períodos amplios sin ingesta de alimento o hacinamiento dentro de los corrales del matadero.

Este estrés prolongado provoca la movilización de las reservas de glucógeno muscular. Esta disminución ocasiona que quede poco glucógeno que degradar anaeróbicamente, por lo que la duración del rigor mortis será corta y la acidificación de la carne será escasa.

El pH elevado reduce el número de miofibrillas desnaturalizadas, por lo que la capacidad de retención de agua permanece casi intacta. Este tipo de carnes no presentan exudado al corte (68).

Así pues, en la carne de caza, la alteración más frecuente corresponde a las carnes DFD (73). En monterías o batidas, tras un período de estrés bastante intenso tratando de escapar de las rehalas y los monteros, el glucógeno muscular se va consumiendo por el estrés y por el propio movimiento del animal y eso resulta en un rigor mortis muy corto con la aparición de la alteración producida por un pH demasiado elevado.

Sin embargo, y lejos de lo que podría pensarse, también se han detectado casos de carnes PSE en la carne de caza. Hoffman encontró que los facóqueros (*Phacochoerus africanus* Gmelin, 1788), al igual que el cerdo doméstico, tienen tendencia a padecer carnes PSE (74).

Prevenir éstas alteraciones en el caso de los animales domésticos de abasto se reduce a las medidas encaminadas a reducir el estrés como reducir la distancia al matadero, alimentar e hidratar convenientemente a los animales durante el trayecto y en los corrales del matadero, disminuir la densidad de animales en dichos corrales y permitir un descanso adecuado previo al sacrificio (69).

En el caso de la carne de caza silvestre, modificar los elementos que causan estrés puede no ser tan fácil como en los animales domésticos de abasto, pero hay investigaciones en las que la calidad de la carne de caza está relacionada con el modo de captura de los animales. El modo de captura que menos afecta a la calidad final es usar un arma de fuego de un calibre pequeño, con silenciador y realizar la captura por la noche (75).

Además de la carne de caza silvestre, podemos encontrar carne de caza de cría, definición que recoge el anexo III - sección III del Reglamento (UE) 853/2004 (76), existen evidencias de que la implantación de buenas prácticas de manejo previo al sacrificio reducen la prevalencia de carnes DFD (77).

Nueva Zelanda es el primer productor de carne de caza de cría del mundo con 4500 granjas de ciervos aproximadamente (78). En España, este sector apenas se ha desarrollado. Hasta hace unos años, las únicas explotaciones que producían carne de caza de cría eran familiares (78). Recientemente, se ha creado en España la primera empresa de cría de ciervos para producción de

carne (79), así como la primera asociación de salas de tratamiento de carne de caza (80).

4.4.1. CONTENIDO PROTEICO DE LA CARNE DE CAZA.

El contenido proteico de la carne depende de factores como la especie, el sexo e incluso la zona anatómica elegida (81).

En la carne de jabalí, el contenido proteico oscila entre un 20,2 % y un 25,9 % (82,83).

En la carne de ciervo encontramos desde un 21,7 % hasta un 22,4 % de contenido proteico (64,84). En el caso de carne de ciervo de cría este valor oscila de un 20,1 % hasta un 23,3 % dependiendo de la pieza cárnica (85).

El contenido proteico en otras especies cinegéticas es similar al obtenido del ciervo y el jabalí. El valor hallado en gamo (*Dama dama* Linnaeus, 1758) es de 21,6 %, en corzo (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) 23,0 %, en reno (*Rangifer tarandus* Linnaeus, 1758) 23,6 %, en impala (*Aepycerus melampus* Lichtenstein, 1812) 22,6 %, y en cebra (*Equus quaga* Boddaert, 1785) 22,8 % (81,86–89).

4.4.2. CONTENIDO EN GRASA TOTAL INTRAMUSCULAR DE LA CARNE DE CAZA.

La carne de caza presenta un contenido graso inferior a los animales de abasto. Esto es debido a que las especies cinegéticas no tienen la disponibilidad de recursos que tienen las especies domésticas de abasto (90). La importancia singular del contenido en grasa de la carne para el consumidor es que está relacionada directamente con la palatabilidad.

La grasa de una canal se puede depositar en cuatro niveles: las cavidades corporales, la zona subcutánea, la grasa intermuscular y la intramuscular. Esta última es la que más influye en la calidad final de la carne.

El contenido de grasa en las especies de caza es muy bajo; en la carne de jabalí encontramos valores que oscilan entre 4,8 % y 2,6 % (82,83).

En el caso de la carne de ciervo el contenido en grasa es sensiblemente más bajo que en el jabalí; oscila de 0,5 % a un 1 % (64,91). En el caso de la carne de ciervo de cría los valores son similares a los obtenidos por ciervos sin alimentación suplementada (85).



Foto del autor.

Figura 2 Canales de ciervo con diferentes grados de engrasamiento

El contenido de grasa en otras especies cinegéticas oscila entre 2,5 % de la gacela (*Gazella* spp. Linnaeus, 1758) al 1,1 % del gamo (81,92).

Al igual que en el contenido proteico, el sexo, la zona de la que se tomaron las muestras e incluso la época del año pueden influir en el contenido de grasa intramuscular (93,94).

El carácter saludable de la carne de caza en este aspecto es importante. Además del bajo contenido en grasa, cumple con las recomendaciones de la

Organización Mundial de la Salud en los ratios ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados y $n - 6/n - 3$ (91), relacionados con diferentes patologías como se refleja en el estudio de Williams *et al.* (95), en el que se encontraron evidencias que sugieren un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata cuanto mayor es el índice de $n-6/n-3$ de las grasas consumidas. Ello es debido a que uno de los productos de oxidación de los ácidos grasos (AG) poliinsaturados son los eicosanoides (96,97). Los AG $n-6$ se convierten en eicosanoides proinflamatorios mientras que los $n-3$ se convierten en antiinflamatorios. Estudios realizados tanto *in vitro* como en animales, indican que la acción de los AG $n-3$ como el eicosapentanoico y el docosahexanoico previene la carcinogénesis mientras que los AG $n-6$ favorecen el desarrollo del tumor (98).

4.4.3. CONTENIDO EN HUMEDAD DE LA CARNE DE CAZA.

La humedad de la carne es responsable, junto con otros factores como el contenido de grasa intramuscular, de la sensación de jugosidad durante el consumo de carne (90).

La humedad en la carne de jabalí oscila de un 70,5 % a un 74,7 % (82).

En la carne de ciervo los valores son un poco más altos; de un 74,4 % a un 76,9 % (64,84). En el caso de carne de ciervo de cría, los valores son más bajos, oscilando entre 73,3 % y 75,3 % dependiendo de la pieza cárnica (85).

En el resto de especies cinegéticas los valores son similares a los obtenidos en la carne de ciervo y jabalí.

4.4.4. CONTENIDO EN CENIZAS DE LA CARNE DE CAZA.

Las cenizas representan el residuo inorgánico que queda tras la oxidación completa de la materia orgánica. Se asocia con el contenido en minerales del alimento, aunque no tienen porqué tener la misma composición ya que pueden existir interacciones entre los mismos.

El contenido en cenizas de la carne de jabalí se sitúa entre el 1,2 % y el 1,1 % (81,82).

Los valores son similares en la carne de ciervo encontrando un 1,1 % (64,81).

En el resto de especies cinegéticas, los valores oscilan desde el 4,2 % de la gacela al 1,1 % del órix (*Orix beisa* Rüppell, 1835) (89,92).

Los macroelementos más concentrados en las diferentes especies cinegéticas son el potasio, el fósforo, el sodio, el magnesio y el calcio. En cuanto a los microelementos, el más habitual es el cinc, seguido del hierro, cobre y manganeso (81).

La carne de caza presenta más microelementos y más fósforo que la carne de los rumiantes domésticos (99).

4.5 PELIGROS BIOLÓGICOS DE LA CARNE DE CAZA.

La carne de caza puede presentar tres tipos de peligros biológicos: parásitos, bacterias o virus. Realizaremos una breve descripción de cada uno de ellos.

4.5.1 PARÁSITOS TRANSMITIDOS POR LA CARNE DE CAZA.

Toxoplasma gondii.

Se descubrió en 1908 por Nicolle y Manceaux. A pesar de que su distribución es mundial y que es probable que ningún otro parásito tenga una variedad tan amplia de hospedadores, sólo hay una especie descrita: *Toxoplasma gondii* (100). A pesar de que sólo se ha identificado una especie, tras el estudio de variabilidad genética de Lehmann *et al.* (101) se encontraron diferencias geográficas entre individuos de *Toxoplasma gondii*.

La enfermedad se puede transmitir de manera congénita (102,103) por ingestión de quistes en carne cruda o poco hecha (104,105) o por la transmisión feco-oral de ooquistes (106,107), forma de resistencia del parásito, expulsados por el gato, su hospedador definitivo.

La sintomatología en el ser humano se caracteriza por producir el aborto en embarazadas. La modalidad leve de la enfermedad, que afecta a hombres y mujeres no embarazadas cursa con fiebre, aumento de tamaño de ganglios linfáticos e inflamación intraocular, aunque se estima que menos del 20% de las personas presenta estos síntomas (108). En el caso de sufrir esa leve infección, se adquiere inmunidad frente a la transmisión congénita de *Toxoplasma gondii*, la cual provoca el aborto (109).

Como hemos visto, la transmisión mediante el consumo de carne infectada con quistes de *Toxoplasma gondii* es una de las vías más importantes de contagio (110). Los animales domésticos de abasto implicados son principalmente la oveja y el cerdo (111).

En el caso de las especies cinegéticas, hay casos documentados de toxoplasmosis humana tras la ingestión de carne de ciervo contaminada (112,113)

La seroprevalencia de toxoplasmosis en España es de un 38,4 % en jabalí y de 15,6 % en ciervo (114,115). En otros animales como el gamo, el corzo y el muflón oscila del 22,8 % al 14,8 % (115).

***Trichinella* spp.**

La triquinosis es una zoonosis producida por las especies del género *Trichinella*, transmitida mediante la ingestión de carne parasitada con larvas viables de este nematodo (116).

La triquinosis ha estado ligada al ser humano desde el comienzo de los tiempos. En un estudio realizado por de Boni *et al.* (117), se encontró un quiste de *Trichinella spiralis* en un músculo intercostal de una momia.

Se descubrió en 1835 por James Paget y Richard Owen. En 1860 el patólogo alemán Friedrich Albert von Zenker relacionó el parásito descubierto por Paget y Owen con una infección grave y ocasionalmente fatal en el hombre (118).

A partir de entonces se comienza a recoger la ocurrencia de brotes de triquinosis. Desde 1860 hasta 1877 se recogieron en Europa (principalmente en Alemania) 150 brotes en los que se diagnosticaron 3800 casos y hubo 281 muertes (119). El primer brote de triquinosis del que se tiene constancia en España sucedió el 9 de diciembre de 1876 en Villar del Arzobispo y se saldó con 30 enfermos y 5 fallecidos (120).

A pesar de que la fuente principal de infestación para el ser humano era el cerdo, esa tendencia está cambiando y las especies implicadas son especies tradicionalmente cinegéticas como el jabalí (*Sus scrofa*, Linnaeus 1758) o el oso (*Fam. Ursidae*, G. Fischer de Waldheim 1817) (121,122).

El ciclo biológico de las especies del género *Trichinella* es autoheteroxeno; el mismo individuo actúa como hospedador definitivo en la fase intestinal y como hospedador intermediario en la fase muscular.

Se diferencian dos ciclos (123):

- El doméstico mantenido por el cerdo doméstico y roedores domésticos.
- El selvático mantenido por jabalíes, roedores y carnívoros silvestres.
- Además de la importancia que tienen los suidos en el ciclo biológico de *Trichinella* spp., la carne de caballo ocasionó durante los años 80 y 90 varios brotes en Francia e Italia, uno de ellos con 642 casos (124).

Hoy en día el género *Trichinella* se divide en ocho especies y cuatro de rango taxonómico indeterminado. las diferentes especies y genotipos y su distribución mundial se recogen en la Tabla 6 en la página siguiente (125).

Tabla 6 Distribución, tipo de ciclo y hospedadores de las diferentes especies y genotipos del género *Trichinella*

Especie o genotipo	Distribución	Ciclo	Hosp. Frecuentes	Hosp. Ocasionales
Encapsuladas				
<i>T. spiralis</i>	Cosmopolita	Doméstico y selvático	Suidos, roedores	Carnívoros
<i>T. nativa</i>	Regiones árticas y regiones subárticas de la región Holoártica.	Selvático	Carnívoros terrestres y marinos	
<i>Trichinella</i> T6	Canadá y EEUU.	Selvático	Carnívoros	
<i>T. britovi</i>	Regiones templadas de la región Paleártica.	Selvático. Raramente doméstico	Carnívoros	Suidos
<i>Trichinella</i> T8	Sudáfrica y Namibia.	Selvático	Carnívoros	
<i>T. murrelli</i>	Zonas templadas de la zona Neártica.	Selvático	Carnívoros	
<i>Trichinella</i> T9	Japón.	Selvático	Carnívoros	
<i>T. nelsoni</i>	Región etíope.	Selvático	Carnívoros	Suidos
<i>Trichinella</i> T12	Argentina.	Selvático	Carnívoros	
No encapsuladas				
<i>T. pseudospiralis</i>	Cosmopolita	Selvático, raramente doméstico	Mamíferos y aves	
<i>T. papuae</i>	Papúa Nueva Guinea, Tailandia	Selvático, raramente doméstico	Suidos, cocodrilos de agua salada	
<i>T. zimbabwensis</i>	Etiopía, Mozambique, Sudáfrica, Zimbabwe	Selvático y doméstico	Cocodrilo del Nilo, lagarto monitor, león.	

Las especies que encontramos en España son *T. spiralis*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*, ésta última aislada recientemente en un jabalí abatido en Gerona (126).

Trichinella spiralis se encuentra especialmente bien adaptada a los suidos, tanto domésticos como silvestres. Esta es la razón por la que en muchos países del mundo el origen de las infestaciones está relacionado con la carne de caza silvestre. Tradicionalmente, la principal fuente de contagio ha sido el cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*, Linnaeus 1758) y jabalí (*Sus scrofa*, Linnaeus

1758). Actualmente se ha aislado *T. spiralis* en 10 carnívoros diferentes, como por ejemplo en el lince (*Felix lynx*, Linnaeus 1758), el puma (*Puma concolor*, Linnaeus 1771), el zorro (*Vulpes vulpes*, Linnaeus 1758) y el coyote (*Canis latrans*, Say 1823) (125).

En el caso de *T. britovi*, se suele encontrar en mamíferos carnívoros salvajes en zonas templadas de Europa, Asia Central y noroeste de África. A pesar de que *T. britovi* pueda infestar a suidos, tanto domésticos como salvajes, la supervivencia larvaria en el músculo estriado de estos hospedadores raramente supera los 9 meses (125). Esto explicaría la aparentemente menor prevalencia relativa de *T. britovi* frente a *T. spiralis*.

El origen de *T. britovi* en España se remonta a 1976. Se aisló en un lobo y se observó un genotipo diferente a *T. spiralis* que se denominó C-76 (127). Fue en 1992 cuando Pozio incluyó al genotipo C-76 dentro de la especie *T. britovi* (128).

El diagnóstico de triquinosis mediante métodos directos en animales se realiza fundamentalmente para prevenir la triquinosis humana. También se pueden utilizar en zorros o mapaches para monitorizar el grado de infestación (123).

A pesar de que en España se siguen detectando canales de cerdos positivos a triquinosis, todas pertenecen a cerdos salvajes o explotaciones domésticas (129).

Dentro de las especies cinegéticas, Pozio *et al.* (130) encontraron una prevalencia del 3 % en zorros y del 0,003 % en jabalí.

En España, la triquinosis humana es enfermedad de declaración obligatoria desde 1944 (131). Durante el período 1994/95 a 2005/06 se produjeron 29 brotes y 394 casos esporádicos (63) provocados por carne y derivados cárnicos de cerdo y jabalí.

4.5.2. BACTERIAS TRANSMITIDAS POR LA CARNE DE CAZA.

El pH actúa como inhibidor del crecimiento bacteriano (132,133). Esta bajada de pH es más acusada en los animales domésticos de abasto que en las especies cinegéticas (134), debido fundamentalmente, al estrés de larga duración ante mortem que suele preceder a la captura (carne fatigada) (90).

A la disminución del pH muy poco acusada, tenemos que unir un sangrado deficiente y al lapso de tiempo que transcurre a temperatura ambiente desde la muerte del animal hasta el eviscerado y posterior almacenamiento en refrigeración, que en ocasiones se puede retrasar hasta seis horas, dependiendo de la modalidad de caza y la ubicación geográfica de la pieza cobrada. Durante ese tiempo, la fermentación de las bacterias anaerobias que habitan el tracto digestivo de los mamíferos hincha las vísceras huecas del aparato digestivo, aumentando la probabilidad de que, en el momento de la evisceración, se dañen y contaminen con su contenido la cavidad abdominal (135).

Todo ello resulta en unas condiciones de pH, temperatura, humedad y nutrientes idóneas para favorecer el crecimiento bacteriano (136).

Generalmente se piensa que las capas profundas de una pieza cárnica sana son estériles. Sin embargo, la contaminación en el interior de un músculo se puede producir si una gran concentración de bacterias accede a través del torrente sanguíneo o del torrente linfático (137). Esta circunstancia es poco probable en el caso de los animales de abasto, donde el tanto el sacrificio y faenado de la canal como los tiempos y temperaturas de refrigeración están muy estructurados, sistematizados y controlados.

Hay que tener en cuenta que los patógenos entéricos pueden habitar el tracto gastrointestinal de las especies de caza sin presentar sintomatología alguna, por lo que pueden no ser detectados durante la inspección ocular de las canales (138). De hecho, la contaminación bacteriana de la carne puede provenir del tracto gastrointestinal (en el caso de *Salmonella* enterica, *Escherichia coli* productora de shiga-toxina, *Campylobacter* spp....) o provenir de la piel (en el caso de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) (139,140).

La contaminación bacteriana se puede agravar por el efecto del disparo; este suele ser un impacto certero en la zona anatómica correspondiente a la articulación del hombro, denominada "círculo de la muerte", pero puede desviarse e impactar más caudalmente, con la consiguiente dispersión de los patógenos entéricos por la cavidad abdominal (141).



Foto del autor

Figura 3 Impacto de un disparo en el "círculo de la muerte"

***Salmonella* spp.**

La fiebre tifoidea es la primera infección producida por especies del género *Salmonella* que se describió con rigor científico. Se atribuye a Bretonneau, un médico francés (142). El género *Salmonella* se crea en el año 1900 por Lignières y la denomina así en honor del veterinario patólogo estadounidense D. E. Salmon, el primero que describió *Salmonella cholerae-suis* (143).

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a las Enterobacteriaceas. Son bacilos mesófilos, Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa produciendo sulfuro

de hidrógeno (excepto algunas cepas de los serotipos Paratyphi A y Cholerasuis) y móviles gracias a sus flagelos peritricos (los serotipos Pullorum y Gallinarum no son móviles) (144). Su rango de crecimiento oscila de 5 °C a 47 °C, aunque su temperatura óptima se sitúa en torno a 37 °C.

El método de clasificación actual es el de Kauffman-White. Clasifica a las bacterias en función de sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi). En el año 1941 se habían caracterizado 100 serotipos diferentes de especies del género *Salmonella*. Esta cifra ha aumentado hasta más de 2400 (143).

El género *Salmonella* se dividió en una especie *Salmonella cholerasuis* con siete subespecies *cholerasuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* e *indica* (145). Para evitar confusiones con el serotipo Cholerasuis de fórmula antigénica 6,7:c1,5 (144), se propuso sustituir esa denominación por *Salmonella enterica* (146). Tras analizar la divergencia en el ADN, Reeves *et al.* (147) propusieron elevar a *Salmonella enterica* subesp. *bongori* al nivel de especie, quedando dividido el género *Salmonella* en dos especies, una de la cual, *S. enterica*, posee seis subespecies.

A pesar de que las bacterias del género *Salmonella* pueden estar adaptadas a un solo hospedador, son los serotipos más extendidos como Typhimurium los responsables de la mayoría de las toxiinfecciones. La dosis infectiva para que aparezca sintomatología clínica se estima en menos de 10³ UFC/g (148).

La salmonelosis no tifoidea es la segunda enfermedad de transmisión alimentaria más notificada en España sólo por detrás de *Campylobacter* spp. en la figura XX se representan los casos de salmonelosis no tifoidea notificados al Sistema de Información Microbiológica del Instituto de Salud Carlos III desde el año 2007 hasta el 2015. Es importante señalar que la notificación de casos sigue una tendencia creciente.

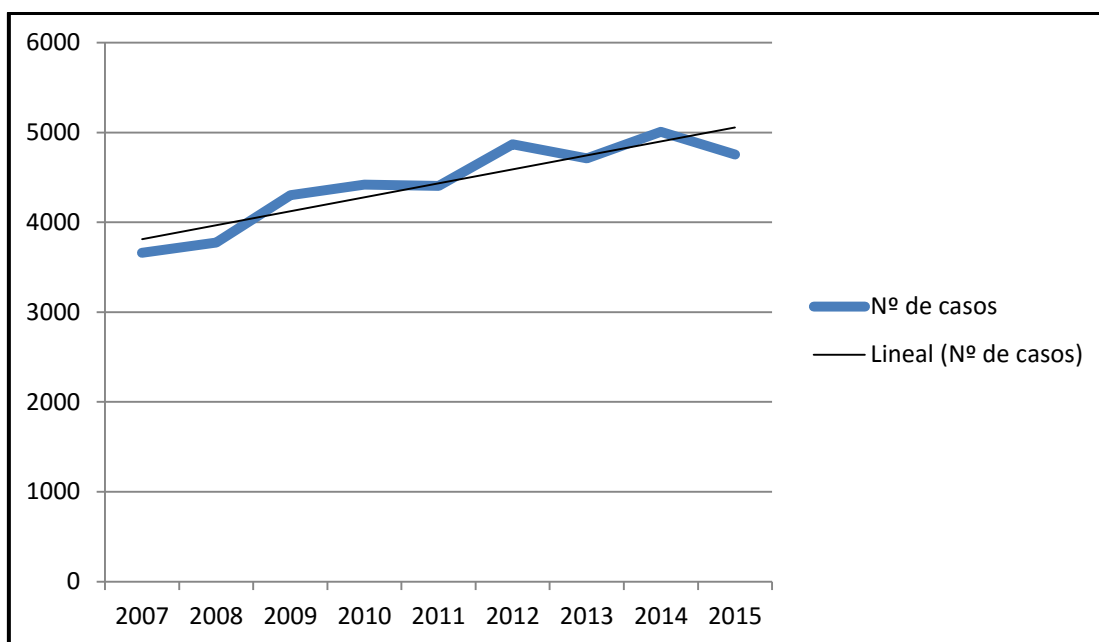


Figura 4 Nº de casos de salmonelosis no tifoidea notificados al Sistema de Información Microbiológica en España. Años 2007-2015

Fuente: Sistema de Información Microbiológica. Instituto de Salud Carlos III.

En el caso de la carne de caza, la prevalencia de éste patógeno alimentario es baja, oscilando desde la ausencia de la bacteria en los estudios de Atanassova (149) llevado a cabo en jabalí, ciervo y corzo; Lillehaug *et al.* (150) y Whalström *et al.* (151). En cambio, Hartung (152) encontró prevalencias del 3,6 % y Jaksic *et al.* (153) aislaron *Salmonella* spp. en un 2,8 % de sus muestras.

A pesar de que la prevalencia de *Salmonella* spp. en carne de caza es muy baja, Vieira-Pinto *et al.* (154) hallaron un 22 % de prevalencia de *Salmonella* spp. en las heces de jabalíes del norte de Portugal.

***Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC).**

Tratando de aislar el agente etiológico del cólera en 1885, Thomas Escherich aisló y estudió el microorganismo que hoy conocemos como *Escherichia coli*. Lo denominó inicialmente *Bacterium coli comune* debido a que lo aisló de las heces de todos sus pacientes (155).

Las bacterias del género *Escherichia* pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativos de 1,1 – 1,5 X 2 – 6 µm. Aparecen aislados o en parejas. Pueden ser móviles gracias a flagelos peritricos o inmóviles y no forman esporas. Son aerobios y anaerobios facultativos por lo que disponen de metabolismo respiratorio y fermentativo. Son oxidasa-negativo y forman ácidos y gas a partir de la mayor parte de hidratos de carbono fermentables.

Es un mesófilo típico ya que puede crecer a temperaturas comprendidas entre 7 °C y 50 °C, alcanzando su crecimiento óptimo a 37 °C, con valores de pH próximos a la neutralidad y un valor mínimo de actividad de agua de 0,95.

Para el serotipado de las diferentes cepas, se ha utilizado la estructura antigénica la cual está formada por el antígeno somático o antígeno O, el antígeno flagelar o antígeno H y el antígeno capsular o antígeno K.

La determinación del antígeno somático se basa en un polímero de la membrana exterior de la bacteria, el lipopolisacárido. Este polímero resulta de la unión covalente de tres moléculas: el lípido A, que es una endotoxina; la región central de diferentes oligosacáridos fosforilados y la zona que denominada antígeno O, la cual está formada por oligosacáridos inmunógenos repetidos (de uno a 40 oligosacáridos).

Si utilizamos el sistema propuesto por Kauffman, se conocen del orden de 180 antígenos somáticos (O1 a O185) (156–158).

En antígeno flagelar se determina utilizando el flagelo de *E. coli*, el cual está formado por varias subunidades de una única proteína, la flagelina, codificada por el gen *fliC*. Se conocen 56 antígenos flagelares (H1 a H56) (156–158).

Tanto la determinación de éstos antígenos como la de los antígenos somáticos se realiza mediante técnicas de aglutinación usando antisueros absorbidos para evitar las reacciones cruzadas (159,160).

El antígeno capsular radica en el polisacárido ácido capsular (CPS). Estos antígenos se clasifican en dos grupos, I y II (144).

- El grupo I está formado por CPS de alto peso molecular (>100 kDa) y únicamente se encuentran en cepas con antígeno somático O8, O9, O20 y O101. Este grupo se divide a su vez, dependiendo de la presencia o ausencia de aminoazúcares en el CPS, en los subgrupos IA o IB respectivamente.
- El grupo II está formado por CPS de bajo peso molecular (<50 kDa) y se encuentran en cepas que no provocan enfermedades entéricas.

Desde que Bray (161) relacionase a *E. coli* con un brote gastrointestinal en niños hasta 1982, las cepas que cursaban con diarrea se clasificaban en tres grupos dependiendo de la virulencia: enteropatógenas, enteroinvasivas y enterotoxigénicas (143).

Hoy en día, en función de sus mecanismos de patogénesis y factores de virulencia se clasifican en seis grupos.

- *E. coli* enteropatogénicos (EPEC). Fue el primer grupo que se estableció y en un primer momento, a esta denominación únicamente respondían las cepas que presentaban un antígeno somático relacionado epidemiológicamente con diarrea infantil (162).
- *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC). Provocan diarreas tanto en el ser humano como en los animales con una gran especificidad de hospedador (144). Las cepas ETEC no invaden las células epiteliales pero producen enterotoxinas que pueden ser termolábiles, muy similar a la toxina del cólera, o termoestables (163).
- *E. coli* enteroinvasivos (EIEC). Los mecanismos de patogénesis son muy similares a *Shigella*. Pueden invadir y multiplicarse en las células epiteliales del intestino grueso del ser humano. Aproximadamente 2/3

de las cepas EIEC son lactosa negativas. Los genes asociados a los factores de virulencia de éstas cepas están codificados tanto en cromosomas como en plásmidos (164).

- *E. coli* enteroagregativos (EAEC). Se denominan con este nombre aquellas cepas con un patrón determinado de adherencia agregada a células HEp-2 cultivadas in vitro (165). Este patrón está codificado en un plásmido (166).
- *E. coli* con adherencia difusa (DAEC). Se denominan así las cepas que presentan un patrón de adherencia difusa en células HEp-2 (167). Una superficie recubierta de fimbrias denominada F1845 les confiere ese fenotipo (168).
- *E. coli* enterohemorrágicos, verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC). Son las cepas que más se han relacionado con enfermedades transmitidas por alimentos (169,170).

El nombre STEC/VTEC se refiere a aquellas cepas que sintetizan toxina Shiga o citotoxina Vero (171), y el nombre EHEC se suele utilizar para englobar aquellas cepas que presentan mismos síntomas y similares características patogénicas que *E. coli* O157:H7 (172).

La mayoría de brotes y casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se han relacionado con el serotipo *E. coli* O157:H7, por lo que se ha clasificado de facto en dos categorías: STEC O157 y STEC no-O157 (173,174).

Aunque los factores de virulencia de este grupo no son siempre los mismos, la característica principal de *E. coli* enterohemorrágicos, es que producen uno o los dos tipos de toxinas Shiga/verotoxinas que son Stx1/VT1 y Stx2/VT2 (175). Ambas se encuentran codificadas en bacteriófagos (144).

En la Tabla 7 se resume la nomenclatura de los diferentes tipos de toxinas Shiga acordado en el *7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections* (176).

Tabla 7 Clasificación y nomenclatura de las diferentes toxinas Shiga

	Tipo	Subtipo
Toxina Shiga	Stx1	Stx1a
		Stx1b
		Stx1c
	Stx2	Stx2a
		Stx2b
		Stx2c
		Stx2d
		Stx2e
		Stx2f
		Stx2g

La virulencia de las diferentes cepas está relacionada con el tipo y subtipo de toxina. Stx2 es la toxina más potente y los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d son los más habitualmente relacionados con SUH (176).

Se ha encontrado que, en diferentes estudios in vitro e in vivo, algunas cepas de STEC tenían la misma capacidad de lesionar el epitelio intestinal de manera similar a las cepas EPEC (177–179).

Esta capacidad la otorga la intimina, proteína de la membrana externa que es la responsable de la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal. Está codificada por el gen *eae*, situado en el *Locus for Enterocyte Effacement* (LEE). La especificidad de este gen es heterogénea para algunas cepas como O55:H7 ó H⁻, O111:H8, O157:H7 ó O157:H⁻ y los grupos O26, O103 y O157 (180).

Otro factor de virulencia importante es la enterohemolisina codificada por el gen *ehxA* y situado en el plásmido EHEC. En el 80% de los casos de colitis hemorrágica (CH) y SUH de Europa y Estados Unidos están implicados serotipos con presencia de LEE y plásmido EHEC (181).

Karmali (182) propuso una clasificación de las cepas STEC en cinco seropatotipos (A a E) según la incidencia y asociación con casos de SUH y brotes.

- Seropatotipo A. Incluye cepas muy virulentas de los serotipos 157:H7 (fermentadoras de sorbitol) y O157:H⁻ (no móviles y fermentadoras de sorbitol).
- Seropatotipo B. Aglutina cepas de serotipos que han causado brotes ocasionales y son aislados comúnmente en casos de SUH y CH como O26:H11, O103:H2, O111:H8, O121:H19, y O145:H⁻.
- Seropatotipo C. En este caso las cepas no han estado implicadas en brotes, pero si se han aislado de pacientes con SUH y CH como O5:H⁻, O91:H21, O104:H21, O113:H21, O121:H⁻ y O165:H25 entre otros.
- Seropatotipo D. Las cepas incluidas en este grupo nunca se han asociado con SUH, pero sí que se han aislado de pacientes con diarrea y CH. Algunos de los serotipos son O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, O117:H7, O119:H25, O132:H⁻, O146:H21, O171:H2, O172:H⁻ y O174:H8.
- Seropatotipo E. En este grupo se incluyen los serotipos no implicados en casos clínicos en el ser humano.

E. coli productoras de toxinas Shiga (STEC) O157

El primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 se llevó a cabo en 1975 a partir de una muestra de heces de un paciente con diarrea sanguinolenta siendo registrado el primer brote en 1982 por el consumo de hamburguesas (174,183).

El número de casos esporádicos producidos por STEC O157 es mucho mayor que el número de brotes descritos, al igual que ocurre con los casos de STEC no-O157 (184).

El grupo poblacional de mayor riesgo son los niños menores de 15 años y adultos mayores de 70 (170,185). Los grupos poblacionales de los que se aíslan mayor número de cepas son niños de 1-4 años y adultos de 60-69 años (186) siendo las mujeres, el grupo que presenta mayor riesgo de sufrir anemia

hemolítica o síndrome hemolítico urémico tras infección por *E. coli* O157:H7 (187).

A pesar de que Griffin y Tauxe (188) establecieron que, aproximadamente el 52% de los brotes alimentarios producidos por *E. coli* O157:H7 están relacionados con productos de origen bovino, también se han descrito brotes y casos en los que han estado implicados animales de interés cinegético. Han actuado de dos maneras; bien dispersando *E. coli* O157:H7 en zonas de cultivos (189), o siendo la carne de caza el vector de la toxiinfección (45,190).

E. coli productoras de toxinas Shiga (STEC) no-O157

La principal problemática de *E. coli* desde el punto de vista epidemiológico es la capacidad que tiene de adquisición y pérdida de factores de virulencia (191). Esto resulta en que serotipos que nunca antes se habían aislado de casos esporádicos o habían estado relacionados con brotes provocan casos y brotes de SUH o CH (192).

Desde que se produjera el primer brote en Japón en 1984 por una cepa de *E. coli* O145:H- (193), los serogrupos no-O157 más relacionados con casos de enfermedad en humanos son el O23, O45, O103, O111, O121 y O145. Estos serogrupos se han denominado como el *big six* por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (194).

A pesar de que las cepas STEC no-O157 provocan más casos esporádicos y brotes que STEC O157, es más difícil realizar el estudio epidemiológico y encontrar los alimentos implicados debido a que *E. coli* O157:H7 se comporta de forma más patógena que la mayoría de las cepas no-O157. Ello conlleva que los brotes de *E. coli* O157:H7 sean reconocidos e investigados más rápidamente (174).

Si bien no se ha descrito ningún brote o caso producido por STEC no-O157 en el que estuviera implicada la carne de caza, sí que se ha aislado STEC no-O157 en carne de caza (195–197).

Listeria monocytogenes.

Se describió por primera vez en 1926 por Murray con la denominación de *Bacterium monocytogenes* (143). Posteriormente se denominó *Listeria monocytogenes*. Gracias a estudios en la hibridación del ADN, se han establecido seis especies del género *Listeria*, que son *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* y *Listeria welshimeri* (198).

Es un cocobacilo aerobio y anaerobio facultativo, Gram positivo, catalasa positivo, oxidasa negativo y no esporogénico. Su temperatura de crecimiento oscila de 0°C a 42°C, siendo entre 30 y 35°C su temperatura óptima (en el caso de *Listeria monocytogenes*). Las seis especies de *Listeria* presentan flagelos en cultivos por debajo de 30°C (199). Es móvil pero en cultivos incubados entre 20 y 30°C se observa un descenso de la motilidad (200). A 37°C se produce una represión de los flagelos, necesaria para alcanzar su máxima virulencia (201).

Una de las características principales de *Listeria monocytogenes* es su capacidad para formar biofilmes. A menos de 20°C se estimula la biosíntesis de esos flagelos, los cuales tienen un papel fundamental en la creación de biofilmes (202).

Listeria monocytogenes puede crecer dentro del rango de pH de 4 a 9,6 (203) y soportan concentraciones de cloruro sódico de hasta el 10% (m/v) (204).

Es un patógeno intracelular y esa característica puede favorecer su supervivencia a temperaturas de pasteurización alta (72 °C durante 15 segundos), tal y como se demostró en el estudio de Doyle *et al.* (205).

El género *Listeria* presenta una distribución muy amplia. Se han aislado en suelos, productos vegetales, agua de bebida, aguas residuales, piensos animales, carne de pollo, deshechos de mataderos y heces de animales sanos (204).

Este microorganismo es patógeno para el hombre y un amplio espectro de animales (206). También puede resultar patógena *Listeria ivanovii*, aunque de forma mucho más esporádica (207,208). El contagio se produce por consumo de alimentos o piensos contaminados.

Es la toxiinfección que más muertes por brote produce, siendo la tasa de mortalidad entre un 20 % y un 40 % (209).

La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en la carne de caza, al igual que sucede con *Salmonella* spp., es muy baja. Oscila del 4,5 % aislado por Atanassova *et al.* (149) a la ausencia de *Listeria monocytogenes* en los trabajos de Paulsen y Winklemayer (210) y Citterio *et al.* (211).

Indicadores de calidad microbiológica.

Los indicadores de calidad microbiológica se utilizan habitualmente para evaluar la inocuidad del alimento, no la calidad (entendida como calidad organoléptica). El indicador ideal de calidad microbiológica debería reunir las siguientes condiciones (212):

- Su aislamiento sea rápido y fácil.
- Ser fácilmente distinguible de otros microorganismos.
- Estar asociado habitualmente con el patógeno cuya presencia deba indicar.
- Estar presente siempre que el patógeno esté presente.
- La carga microbiana del indicador se correlacione con la carga del patógeno.
- Las necesidades de crecimiento y ritmo de crecimiento sean, al menos, las mismas que las del patógeno.
- La tasa de muerte sea, al menos, la misma que la del patógeno. Idealmente, debería sobrevivir un poco más que el patógeno.
- No aislarse en aquellos alimentos que estén libres del patógeno.

El concepto se desarrolló originalmente para controlar patógenos transmitidos a través del agua potable (213).

Se ha tratado de diferenciar entre organismo indicador, relacionado con la calidad microbiológica en general, y organismo índice, cuya presencia implicaría

la de un patógeno alimentario. Esta distinción conlleva una gran complejidad en su aplicación y no hay un acuerdo general sobre estos términos (143).

Aerobios mesófilos totales.

Este indicador engloba una gran variedad de microorganismos clasificados según su temperatura de crecimiento y tolerancia al oxígeno. Se usan para tener una idea general de la calidad microbiológica del alimento (214).

Tienen la limitación que no pueden utilizarse en alimentos sometidos a fermentación, puesto que el alto número de microorganismos obedece únicamente a su proceso productivo (143).

Enterobacteriáceas.

Esta familia engloba 44 géneros y 176 especies de bacterias, y ese número continúa creciendo (144). Son bacterias ubiquitarias y son patógenas para plantas (215), animales terrestres (216) y marinos (217), y por supuesto el ser humano (218).

El uso de las enterobacteriáceas como indicador de calidad microbiológica está aumentando porque el uso exclusivo de coliformes y coliformes fecales nos puede dar una falsa sensación de seguridad en el caso de que la contaminación mayoritaria provenga de microorganismos lactosa negativos. Estos microorganismos incluyen a patógenos como *Salmonella*, *Shigella* y algunas cepas enteroinvasivas de *E. coli* como O124 (143).

Las Enterobacteriáceas incluyen más géneros de origen no fecal como *Erwinia* y *Serratia*, frecuentemente asociados a plantas, por lo que pueden dar más información sobre la calidad microbiológica del producto (144).

En el caso de la carne de caza, son indicadores de contaminación fecal (219).

Coliformes totales.

Los coliformes son bacilos Gram negativos no esporogénicos que fermentan la lactosa y forman colonias negras y brillantes en agar Endo (220).

Estos microorganismos están formados por cuatro o cinco géneros de Enterobacterias que son: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Raoultella*. Este último formaba parte del género *Klebsiella* (221).

Hay razones objetivas para usar los coliformes totales, además de *E. coli*, como indicadores de seguridad alimentaria. Buttiaux y Mossel (222) llegaron a la conclusión de que algunos patógenos pueden sobrevivir a *E. coli* en comidas congeladas, refrigeradas o irradiadas. Stiles y Lai Kong (223) concluyeron que *Klebsiella pneumoniae* y posiblemente *Raoultella* spp. pueden ser mejores indicadores que *E. coli* en plantas de envasado de carnes.

Escherichia coli.

Escherichia coli puede considerarse como el ser vivo mejor conocido de cuantos habitan el planeta Tierra (143). Debido a su presencia habitual en las heces humanas, fácil aislamiento y buena supervivencia en agua, se usó en un primer momento como indicador de microorganismos patógenos en el agua potable.

Es el indicador más relacionado con una contaminación fecal de los productos alimenticios, por lo que, además de establecer un recuento de coliformes totales, es muy recomendable investigar este microorganismo (212).

En el caso de la carne de caza, puede indicar un lapso de tiempo elevado hasta que la canal ha sido refrigerada (210), contaminación cruzada del contenido intestinal (224) o que la pieza fuese abatida con un disparo abdominal (149).

Estafilococos coagulasa positivos.

Con esta denominación encontramos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini* y *Staphylococcus schleiferi* subesp. *coagulans*. *Staphylococcus aureus* es la especie más implicada en toxiinfecciones alimentarias de este grupo (225).

A pesar de que muchos autores lo consideran un patógeno alimentario (226), también pueden interpretarse como un indicador de higiene personal y buenas prácticas de manipulación de los trabajadores (227).

El *Staphylococcus aureus* se describió primeramente como un microorganismo piogénico por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston en 1882 (143). No fue hasta 1914 cuando Barber estableció la relación entre el consumo de leche procedente de vacas mamíticas con la enfermedad (228).

Es un coco anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa positivo. En cuanto a su temperatura de crecimiento se considera un mesófilo con un rango que oscila de 7 a 48 °C. El rango de pH abarca desde 4,0 a 9,8 y es capaz de crecer con un 20 % de cloruro sódico y actividad agua de 0,8.

A pesar de no producir esporas y ser un microorganismo termosensible, su patogenicidad reside en una ubiquidad, resistencia a los antibióticos y la producción de una toxina termoestable y resistente a las enzimas del tracto digestivo (229).

La prevalencia en la carne de caza de estafilococos coagulasa positivos oscila alrededor del 0 % al 9,0 % (230–233), salvo en el estudio de Decastelli *et al.* (219), en el que se obtuvo una prevalencia del 76,0 % alcanzando valores de 10⁴ UFC/g.

Otras bacterias transmitidas por la carne de caza

Además de los microorganismos implicados en nuestro estudio, podemos encontrar en la literatura científica multitud de estudios referentes a otras bacterias transmitidas por la carne de caza, como por ejemplo *Yersinia enterocolitica* (234,235), *Campylobacter* spp. en carne de jabalí, ciervo y corzo (149,236), *Campylobacter coli* en carne de avestruz (237) y *Clostridium perfringens* también en carne de jabalí, ciervo y corzo (238).

4.5.3. VIRUS TRANSMITIDOS POR LA CARNE DE CAZA.

Virus de la hepatitis E.

La hepatitis E es una enfermedad de distribución mundial. La epidemiología de la enfermedad difiere entre los países desarrollados y aquellos que están en vías de desarrollo. En estos últimos se comporta como una enfermedad aguda y autolimitante. Es en los países desarrollados donde causa una enfermedad crónica que suele evolucionar a cirrosis (239).

Uno de los reservorios del virus de la hepatitis E es la carne de caza, como lo demuestran los estudios de Tomiyama *et al.* (240), Rutjes *et al.* (241), Kukiela *et al.* (242), Laska *et al.* (243) y Martinelli *et al.* (244).

4.5.4 CONTAMINACIÓN ABIÓTICA DE LA CAZA.

Dentro de la contaminación abiótica podríamos enumerar sustancias químicas como los antibióticos, residuos hormonales, pesticidas y metales pesados, entre otros (245,246).

Las especies cinegéticas se han utilizado como indicadores biológicos de contaminación medioambiental (247,248).

La carne de caza en España está libre de residuos hormonales, restos de antibióticos y otros fármacos (249). Ello no implica que su consumo esté exento de cualquier riesgo; además de los riesgos bióticos, la carne de caza puede vehicular contaminantes como los metales pesados y representar un riesgo para los consumidores de este tipo de carne (250).

La distribución de los metales pesados es muy amplia. Su entrada a la cadena trófica se puede producir desde las tres áreas del medio ambiente: el aire, el agua y el suelo. Está ampliamente analizado por la literatura científica que los metales pesados suponen un riesgo para el ser humano (251,252).

Sin embargo, el Reglamento 1831/2003 (253) sólo establece límites legales para la carne y vísceras para los animales domésticos de abasto, no para la carne de caza.

Los principales metales pesados que se relacionan con patologías humanas y que se transmiten por el consumo de carne de caza son el plomo y el cadmio (254).

Plomo.

La importancia del plomo como contaminante radica en su ubiquidad y su uso dentro del ámbito industrial, ya que presenta gran resistencia a la meteorización y a la acción de los ácidos. Hasta la prohibición generalizada de su uso como aditivo en los carburantes, se estimó que el 76% del plomo emitido a la atmósfera provenía de su uso en la gasolina (255).

El plomo puede provocar alteraciones reproductivas en ambos sexos, efectos adversos en el desarrollo neurológico del feto y retraso cognitivo en niños menores de dos años (256–258).

El plomo es el material del que están fabricados los diferentes proyectiles que se utilizan para abatir las piezas de caza. El efecto que ocasiona el plomo tanto en el medio ambiente, como en el ser humano se puede resumir en cuatro puntos (254):

- Mortalidad adicional de aves acuáticas y especies terrestres por la intoxicación de plomo tras la ingestión de perdigones.
- Mortalidad de depredadores, aves rapaces fundamentalmente, por la ingestión de estos perdigones a través de la carne de sus presas.
- Contaminación ambiental a largo plazo por el depósito del plomo.
- Ingestión de plomo por parte del ser humano a través de la carne de caza contaminada.

El plomo se deposita fundamentalmente a nivel de tejido óseo y renal (256).

En un estudio realizado en seis ciudades de Dakota del Norte se observó que las personas que habían consumido recientemente carne de caza presentaban unos niveles de plomo en sangre más elevados que aquellos que no habían consumido carne de caza (259).

Cadmio.

El cadmio no se encuentra aislado en la naturaleza; habitualmente lo podemos encontrar asociado con cinc y cobre. Son estas asociaciones, con elementos de baja toxicidad, las que pueden hacer subestimar la toxicidad del cadmio (260).

La fuente principal de cadmio en el medio ambiente está ligada a la industria del cinc, cobre o fósforo y en el tabaco. Se incorpora a la cadena trófica en las partes aéreas de las plantas (260).

La absorción de cadmio en el ser humano a nivel intestinal es baja, entre 3-5%, pero es acumulado en el hígado y en el riñón con una vida biológica media que oscila de 10 a 30 años (254).

La toxicidad del cadmio suele ser crónica. Las lesiones principales son el daño renal, con las patologías secundarias que pueden desarrollarse, alteraciones óseas, fallos del aparato reproductor masculino fundamentalmente y tiene efectos carcinogénicos (256,260).

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer ha clasificado al cadmio como un carcinógeno humano (grupo 1). La exposición al cadmio se ha asociado con mayor riesgo de cáncer en pulmón, endometrio, vejiga y de mama (261).

4.6. LA LEGISLACIÓN DE LA CAZA.

4.6.1 HISTORIA DE LA LEGISLACIÓN CINEGÉTICA.

Como hemos visto anteriormente, la época romana fue el último período de la historia en el que la caza no tenía dueño; únicamente pertenecía a quien la cazaba. Ya en las Partidas de Alfonso X el Sabio se prohibía cazar en predio ajeno sin permiso del dueño (262). Además de que el privilegio de la caza se extendiera a los estamentos noble y eclesiástico, se permitió que en los lugares donde la caza estaba considerada un bien comunal, se siguiese practicando con libertad. Dicha libertad no estaba exenta de la intervención de los poderes públicos (263).

Tras estos intentos legisladores, no fue hasta el reinado de Carlos IV cuando se recopiló toda la normativa existente hasta aquel momento y se dictó la Ley XI del libro VII del Título XXX de la Novísima Recopilación del 9 de junio de 1805 (264). A pesar de ser fundamentalmente una recopilación de toda la legislación aprobada hasta el momento, introdujo elementos novedosos como el establecimiento de una veda general.

A pesar de que el siglo XIX fue muy convulso en lo político, y eso, obviamente afectó a la legislación cinegética, en 1879 se promulga la primera ley de caza en España. Siguiendo la línea marcada por los Decretos de 3 de mayo de 1834 y 13 de septiembre de 1837, hace especial hincapié en adscribir el derecho de caza a la propiedad de la tierra donde se practica (263).

Esta ley no dispuso de Reglamento que la desarrollase y fue sustituida por la Ley de Caza de 16 de mayo de 1902. Esta sí que se desarrolló mediante el Reglamento de 3 de julio de 1903. Ambos restauran, en la medida de lo posible, la libertad de practicar la caza como se recoge en el artículo 9 de la ley: *Este derecho puede ejercitarse en los terrenos del Estado, de los pueblos, comunidades civiles o fincas de propiedad particular que no estén vedados. En los que estén visiblemente cerrados ó acotados sólo podrán cazar los dueños ó arrendatarios ó las personas á quienes aquellos autoricen precisamente por escrito*". En el Reglamento lo completa en su artículo 8: *"En los terrenos que no reúnan las circunstancias marcadas en el artículo anterior y en el siguiente, se podrá cazar libremente y sin permiso escrito del dueño, siempre y cuando estén levantadas las cosechas. El cazador que haciendo uso de su derecho, causare daños en estos terrenos, será responsable de ellos"*.

Esta fue la última ley de caza derogada en España. A partir de ahí, la legislación cinegética vigente en España, hasta el 2 de febrero de 2016, ordenada cronológicamente es:

4.6.2. LEGISLACIÓN EUROPEA.

- Reglamento (CE) 178/2002, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
- Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Reglamento (CE) nº854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Reglamento (UE) nº 150/2011 de la Comisión, de 18 de febrero de 2011, por el que se modifica el anexo III del Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a la caza de cría y la caza silvestre y a la carne de caza de cría y de caza silvestre.
- Reglamento de ejecución (CE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne.

4.6.3. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA.

- Ley 37/1966, de 31 de mayo, por la que se crean Reservas Nacionales de Caza. BOE nº 131 de 2 de junio de 1966.
- Ley 1/1970, de 4 de abril, de caza. BOE nº 82 de 6 de abril de 1970.
- Real Decreto 1095/1989, de 8 de septiembre. Se declaran las especies objeto de caza y pesca en desarrollo de lo establecido en el art. 33.1 de la Ley 4/1989, y se establecen normas para su protección.
- Real Decreto 1118/1989, de 15 de diciembre. Se determinan las especies objeto de caza y pesca comercializables, en desarrollo de lo

establecido en el art. 34 c) de la Ley 4/1989 de 27 de marzo, con el fin de garantizar la conservación de las especies autóctonas y la preservación de la diversidad genética.

- Real decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. BOE nº 126 de 27 de mayo de 2006.
- Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. BOE nº 299 de 14 de diciembre de 2007.
- Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras. BOE nº185 de 3 de agosto de 2013.

4.6.4. LEGISLACIÓN AUTONÓMICA.

- Ley 2/1989, de 6 de junio, de caza.

Aprobada por la Junta General del Principado de Asturias y publicada en el BOPA nº 140 de 17 de junio de 1989 y BOE nº 157 de 3 de julio de 1989.

- Ley 4/1996, de 12 de julio, por la que se regula el ejercicio de la caza en la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

Aprobada por las Cortes de Castilla y León y publicada en el BOCL nº 140 de 22 de julio de 1996 y BOE nº 210 de 30 de agosto de 1996.

- Ley 9/1998, de 2 de julio, de Caza de La Rioja.

Aprobada por la Diputación General de La Rioja y publicada en el BOLR nº 80 de 4 de julio de 1998 y BOE nº 164 de 10 de julio de 1998.

- Ley 7/1998, de 6 de julio, de caza de Canarias.

Aprobada por el Gobierno de Canarias y publicada en el BOIC nº 86 de 15 de julio de 1998 y BOE nº 182 de 31 de julio de 1998.

- Ley 7/2003, de 12 de noviembre, de Caza y Pesca Fluvial de la Región de Murcia.

Aprobada por la Asamblea de la Región de Murcia y publicada en el BORM nº 284 de 10 de diciembre de 2003 y BOE nº 47 de 24 de febrero de 2004.

- Ley 13/2004, de 27 de diciembre, de Caza de la Comunidad Valenciana.

Aprobada por la Generalidad Valenciana y publicada en el DOCV nº 4913 de 29 de diciembre de 2004 y BOE nº 38 de 14 de febrero de 2005.

- Decreto 182/2005, de 26 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Ordenación de la Caza. (Desarrolla la ley 8/2003, de 28 de octubre, de la flora y fauna silvestres).

Aprobado por la Junta de Andalucía y publicado en el BOJA nº 154 de 9 de agosto de 2005.

- Ley Foral 17/2005, de 22 de diciembre, de Caza y Pesca de Navarra.

Aprobada por el Gobierno de Navarra y publicada en el BON nº 155 de 28 de diciembre de 2005 y BOE nº 17 de 20 de enero de 2006.

- Ley 6/2006, de 12 de abril, balear de caza y pesca fluvial.

Aprobada por el Gobierno de las Islas Baleares y publicada en el BOIB nº 61 de 27 de abril de 2006 y BOE nº 122 de 23 de mayo de 2006.

- Ley de Cantabria 12/2006, de 17 de julio, de Caza de Cantabria.

Aprobada por el Parlamento de Cantabria y publicada en el BOC nº 148 de 2 de agosto de 2006 y BOE nº 205 de 28 de agosto de 2006.

- Ley 14/2010, de 9 de diciembre, de caza de Extremadura.
Aprobada por la Junta de Extremadura y publicada en el DOE nº 239 de 15 de diciembre y BOE nº 314 de 27 de diciembre de 2010.
- Ley 2/2011, de 17 de marzo, de Caza.
Aprobada por el Parlamento Vasco y publicada en el BOPV nº 61 de 29 de marzo de 2011 y BOE nº 88 de 13 de abril de 2011.
- Ley 13/2013, de 23 de diciembre, de caza de Galicia.
Aprobada por la Junta de Galicia y publicada en el DOG nº 4 de 8 de enero de 2014 y BOE nº 25 de 29 de enero de 2014.
- Ley 3/2015, de 5 de marzo, de Caza de Castilla-La Mancha.
Aprobada por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y publicada en DOCM nº 49 de marzo de 2015 y BOE nº 148 de 22 de junio de 2015.
- Ley 1/2015, de 12 de marzo, de Caza de Aragón.
Aprobada por el Gobierno de Aragón y publicada en el BOA nº 58 de 25 de marzo de 2015 y BOE nº 114 de 13 de mayo de 2015.
- Resolución AAM/605/2015, de 15 de marzo, por la que se fijan las especies de aprovechamiento cinegético, los periodos hábiles de caza y las vedas especiales para la temporada 2015 hasta 2016 en todo el territorio de Cataluña.
Aprobada por la Generalidad de Cataluña y publicada en el DOGC nº 6844 de 2 de abril de 2015.
- Orden 591/2015, de 23 de abril, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se fijan las limitaciones y épocas hábiles de caza que regirán durante la temporada 2015-2016.
Aprobada por la Asamblea de Madrid y publicada en el BOCM nº 112 de 13 de mayo de 2015.

5. JUSTIFICACIÓN.

La importancia económica de la caza, y por tanto de la carne y derivados cárnicos de los animales abatidos tiene un gran impacto a nivel de actividad recreativa en la sociedad actual.

El principal destino de la carne de caza abatida en España es la exportación de este producto alimenticio a países consumidores del centro de Europa, principalmente Francia y Alemania (265). Además de destinar un porcentaje muy importante a la exportación, también existe un mercado interior en alza para la carne de caza en España. Hay estudios que cifran este consumo entre 40 y 50 gramos/día aproximadamente (259,250). Esta cantidad, aunque pueda parecer pequeña, sólo es tres veces inferior al consumo de carne roja (266).

Como hemos visto, la carne de caza se obtiene en lances que no se ajustan a las normas higiénicas de sacrificio más elementales, que pueden repercutir en la calidad microbiológica del producto final.

Además, la legislación Europea que regula desde un punto de vista microbiológico la seguridad alimentaria y la higiene de los procesos no hace mención específica a la carne de caza; únicamente hace mención a los preparados cárnicos y a la carne picada y preparados de carne a base de especies distintas a las aves de corral destinados a ser consumidos cocinados (267).

Tampoco en la regulación del plomo y cadmio, principales metales pesados transmitidos mediante la carne de caza, se hace mención específica a este tipo de carne (253). Sólo en la detección de triquinas se establecen criterios específicos para las especies cinegéticas cuya carne es comercializable como por ejemplo el jabalí (268).

La seguridad alimentaria según la Organización para la Agricultura y la Alimentación “[...] *existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana.*”.

Esta definición pone de manifiesto que, además de accesibles, los alimentos deben ser inocuos y nutritivos, por lo que sería interesante ahondar en las condiciones higiénico-sanitarias y propiedades nutricionales de este tipo de carne.

6. HIPÓTESIS.

La importancia de la carne de caza desde un punto de vista económico y de sus características nutricionales y culinarias la hacen tener un valor cada vez más reconocido.

Por otra parte, su forma de obtención y los peligros que puede conllevar la hacen potencialmente insalubre.

La investigación de su ecología microbiana, así como el estudio de los riesgos establecidos en su obtención, transporte y manipulación con relación a los peligros bióticos es de singular importancia para prevenir posibles toxiinfecciones alimentarias.

Por otro lado y atendiendo a su valoración nutricional que, según la FAO, forma parte de su seguridad alimentaria sería de capital importancia para considerarla como un recurso de abastecimiento humano de macronutrientes.

7. OBJETIVOS.

En el desarrollo de esta tesis nos hemos marcado cinco objetivos:

Determinar la calidad microbiológica de los derivados cárnicos de ciervo y jabalí mediante el recuento de microorganismos indicadores.

Investigar la presencia de microorganismos patógenos alimentarios en los derivados cárnicos de ciervo y jabalí.

Realizar un estudio nutricional del contenido en macronutrientes de los derivados cárnicos de ciervo y jabalí.

Comparar los valores microbiológicos obtenidos con los establecidos en la legislación vigente para las especies domésticas de abasto más próximas a las especies cinegéticas del estudio.

Comparar los valores nutricionales obtenidos con los publicados para las especies domésticas de abasto más próximas a las especies cinegéticas del estudio.

8. MATERIAL Y MÉTODOS.

8.1. MUESTRAS ANALIZADAS DE CARNE DE CAZA.

Se han analizado un total de 90 muestras. 59 de ellas correspondían a preparados cárnicos de ciervo y 31 a preparados cárnicos de jabalí. 28 muestras de de preparados cárnicos de ciervo se han obtenido directamente de la sala de tratamiento de caza OSBRUMA S.A., mientras que el resto, 31 preparados cárnicos de ciervo y 31 preparados cárnicos de jabalí se han adquirido en grandes superficies de la zona sur de Madrid. La presentación elegida ha sido preparado cárnico de jabalí y de ciervo (carne para estofado).

Ninguna de las muestras analizadas excedía la fecha de consumo preferente y la totalidad presentaba un etiquetado conforme al Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor (269).

A 62 muestras de preparados cárnicos se les han realizado los análisis que se recogen en la Tabla 8. A las 28 muestras de preparado cárnico de ciervo, obtenidas directamente del distribuidor, únicamente se les ha realizado las técnicas correspondientes al análisis físico-químico.

Tabla 8 Análisis realizados en este estudio

Tipo de análisis	Técnica utilizada	Parámetro analizado
Microbiológico	Microbiología automatizada	Aerobios mesófilos totales
		Enterobacterias totales
		Recuento de indicadores de calidad microbiológica
		Coliformes totales
		<i>Escherichia coli</i>
		Estafilococos coagulasa positivos
Biología molecular	Microbiología clásica	Investigación de <i>Salmonella</i> spp.
		Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i>
		Confirmación positivos <i>Salmonella</i> spp.
	Real Time PCR	Investigación de <i>Salmonella</i> spp.
		Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i>
		Investigación de STEC
Análisis físico-químico	Método Kjeldahl	Contenido total de proteínas

Tabla 8 Análisis realizados en este estudio

Tipo de análisis	Técnica utilizada	Parámetro analizado
	Método Soxhlet	Contenido total de grasas
	Gravimetría	Contenido total de humedad
		Contenido total de cenizas.

8.2. MATERIALES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

8.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA INICIAL.

Reactivos.

- Agua de peptona tamponada de bioMérieux®.

Medio listo para su empleo, cuya composición se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9 Composición del agua de peptona tamponada

Digestato enzimático de tejidos animales	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato de hidrógeno disódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	9 g.
Fosfato de hidrógeno dipotásico (KH_2PO_4)	1,5 g.
Agua	1000 ml.

Material.

- Peso diluidor gravimétrico IUL Intruments®, con una resolución de 0,1 g. y una tolerancia de $\pm 0,2$ g.
- Pipetas de capacidades nominales de 10 y 1 ml., graduadas en divisiones de 0,5 y 0,1 ml. y con una tolerancia de $\pm 0,2$ %.
- Homogeneizador Stomacher® 400 Circulator.
- Bolsas para Stomacher® estériles con filtro.
- Pinzas y tijeras estériles.

8.2.2. RECuento DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

Reactivos.

- Agua ultra pura estéril como diluyente secundario.
- Medio de cultivo TEMPO® TVC.

Cada frasco contiene una dosis individual de medio de cultivo deshidratado. Dosis para 4 ml. En la Tabla 10 se resume la fórmula teórica en g/l de solución reconstituida.

**Tabla 10 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida
TEMPO® TVC**

Sustancia nutritiva y suplementos de crecimiento	4,5
Sistema de tampón	25,7
Sustratos	0,06
Agente antiespumante	0,4

- Medio de cultivo TEMPO® EB

Cada frasco contiene una dosis individual de medio de cultivo deshidratado. Dosis para 4 ml. En la Tabla 11 se resume la fórmula teórica en g/l de solución reconstituida.

**Tabla 11 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida
TEMPO® EB**

Peptonas vegetales	10
Azúcares	26
Suplementos de crecimiento	0,5
Cloruro sódico	5
Sistema de tampón	16
Deoxicolato sódico (bovino y ovino)	0,75
Indicador fluorescente	0,05
Agente antiespumante	0,4

- Medio de cultivo TEMPO® TC

Cada frasco contiene una dosis individual de medio de cultivo deshidratado. Dosis para 4 ml. En la Tabla 12 se resume la fórmula teórica en g/l de solución reconstituida.

**Tabla 12 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida
TEMPO® TC**

Lactosa (bovina)	10
Nutrientes (bovinos y porcinos)	19
Suplementos de crecimiento	0,25
Sistema de tampón	5,16
Desoxicolato sódico (bovino y ovino)	0,75
Indicador fluorescente pH	0,06
Agente antiespumante	0,4

- Medio de cultivo TEMPO® EC

Cada frasco contiene una dosis individual de medio de cultivo deshidratado. Dosis para 4 ml. En la Tabla 13 se resume la fórmula teórica en g/l de solución reconstituida.

**Tabla 13 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida
TEMPO® EC**

Bio-Soja y sustancias nutritivas	9
Sal sódica MOPS (3-(N-morfolino) propanosulfónico)	20,8
Suplemento de crecimiento	0,25
Ácido MOPS	12,6
Desoxicolato sódico (bovino y ovino)	0,7
Sustrato y reguladores enzimáticos	0,19
Agente antiespumante	0,4

- Medio de cultivo TEMPO® STA

Cada frasco contiene una dosis individual de medio de cultivo deshidratado. Dosis para 4 ml. En la Tabla 14 se resume la fórmula teórica en g/l de solución reconstituida.

Tabla 14 Fórmula teórica en g/l de solución reconstituida

TEMPO® STA

Peptonas de animales (bovina y porcina) y de verduras	12,5
Azúcares y suplementos de crecimiento	11
Sistema de tampón	10
Agentes selectivos	10,25
Indicador fluorescente pH	0,06
Agente antiespumante	0,4

Material.

- Agitador excéntrico de tubos.
- Pipetas de capacidades nominales de 10 ml. y de 1 ml., graduadas en divisiones de 0,5 ml. y de 0,1 ml. respectivamente y con una tolerancia de $\pm 2\%$.
- Dispensador automático con una tolerancia de $\pm 2\%$.
- Estufas de cultivo MEMMERT® con los siguientes rangos de trabajo: $31 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Tarjetas TEMPO® TVC, TEMPO® EB, TEMPO® TC, TEMPO® EC y TEMPO® STA, listas para su empleo, con su tubo de transferencia.
- Unidad de llenado TEMPO® de bioMérieux® (Figura 5).
- Unidad de lectura TEMPO® de bioMérieux® (Figura 6).
- Software TEMPO® de bioMérieux®.



Figura 5 Unidad de llenado TEMPO® de bioMérieux®



Figura 6 Unidad de lectura TEMPO® de bioMérieux®

8.2.3. INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. MEDIANTE MÉTODO AUTOMATIZADO.

Reactivos.

- Kit VIDAS® *Salmonella* SLM compuesto por: cartuchos SLM, conos SPR® SLM, estándar SLM, control positivo SLM y control negativo SLM
- Caldo *Salmonella* Xpress 2 (SX2®) de bioMérieux®. Medio listo para su empleo, cuya composición se detalla en la tabla XX.

Tabla 15 Composición en g/l del caldo de cultivo selectivo SX2®

Peptona de caseína y de carne (bovina o porcina)	15
Sistema de tampón	20
Mezcla de sales	20
Extracto de levadura	5
Glucosa	0,5
Agentes selectivos	0,25

Material.

- Pipetas de capacidad nominal de 1 ml., graduadas en divisiones de 0,1 ml. y con una tolerancia de $\pm 2 \%$.
- Equipo mini-VIDAS® (Figura 7).
- Bloque calefactor VIDAS® Heat & Go
- Estufas de cultivo MEMMERT® con los siguientes rangos de trabajo: $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $41,5 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Agitador de tubos tipo vórtex.
- Asas de siembra de platino y de picadura.



Figura 7 Equipo mini-VIDAS®

8.2.4. MÉTODO HORIZONTAL DE CONFIRMACIÓN DE POSITIVOS A *SALMONELLA* SPP.

Reactivos.

- Agua ultra pura estéril.
- Medio de cultivo Hektoen de OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 16.

Tabla 16 Composición en g/l del medio de cultivo selectivo Hektoen

Peptona	12
Extracto de levadura	3
Lactosa	12
Sacarosa	12
Salicilina	2
Sales biliares	9
Cloruro de sodio	5
Tiosulfato sódico	5
Citrato férrico-amónico	1,5
Fuchina ácida	0,1
Azul de bromotimol	0,065
Agar	14

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y, ajustando si fuese necesario, el pH a $7,5 \pm 0,2$. Se dispensó 15 ml. por placa Petri.

- Medio de cultivo Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 17.

**Tabla 17 Composición en g/l del medio de cultivo selectivo
XLD**

Amonio hierro (III) citrato	0,8
Extracto de levadura	3
Lactosa	7,5
L-lisina	5
Rojo fenol	0,08
Sacarosa	7,5
Cloruro de sodio	5
Desoxicolato de sodio	1
Tiosulfato de sodio	6,8
D(+)-Xilosa	3,5
Agar	13,5

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y, ajustando si fuese necesario, el pH a $7,4 \pm 0,2$. Se dispensó 15 ml. por placa Petri.

- Agar nutritivo OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 18.

**Tabla 18 Composición en g/l del medio de cultivo agar
nutritivo**

Peptona	5
Lab lemco poder	1
Cloruro de sodio	5
Extracto de levadura	2
Agar	15

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y, ajustando si fuese necesario, el pH a $6,8 \pm 0,1$. Se dispensó en condiciones estériles 10 ml. por tubo.

Se dejó reposar el tubo inclinado 30° con la horizontal hasta que se solidifique el medio.

- Agar urea OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 19.

Tabla 19 Composición en g/l del medio de cultivo agar urea

Peptona	1
Glucosa	1
Cloruro de sodio	5
Dihidrógeno-ortofosfato de potasio	0,8
Fosfato disódico	1,2
Rojo fenol	0,012
Agar	15

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y, ajustando si fuese necesario, el pH a $6,8 \pm 0,1$. Se añadió el suplemento de urea al 40 % en condiciones estériles y se dispensó 10 ml. por tubo.

Se dejó reposar el tubo inclinado 30° con la horizontal hasta que se solidifique el medio.

- Agar Triple Sugar Iron (TSI) OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 20.

Tabla 20 Composición en g/l del medio de cultivo agar TSI

Extracto de carne	3
Extracto de levadura	3
Peptona	20
Lactosa	10
Cloruro sódico	5
Dextrosa	1
Sacarosa	10
Citrato férrico	0,3
Hiposulfito sódico	0,3
Rojo fenol	0,05
Agar-agar	12

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y, ajustando si fuese necesario, el pH a $7,4 \pm 0,2$ y se dispensó en condiciones estériles 12 ml. por tubo.

Se dejó reposar el tubo inclinado 30° con la horizontal hasta que se solidifique el medio.

- Tiras Api®-20E de bioMérieux®.

Material.

- Campana de flujo laminar NUAIRE®, de seguridad biológica nivel II.
- Asas de siembra de platino y de picadura.
- Estufas de cultivo MEMMERT® ajustadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

8.2.5. RECUENTO EN PLACA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

Reactivos.

- Solución salina de peptona (TSB) de bioMérieux®

Medio listo para su empleo, cuya composición se detalla en la Tabla 21.

Tabla 21 Composición de la solución salina de peptona

Peptona	1 g.
Cloruro sódico	8,5 g.
Agua purificada	1000 ml.

- Medio de cultivo Agar Listeria según Otaviani y Agosti (ALOA) de bioMérieux®. Es un medio suministrado en placas de Petri listo para su empleo, cuya composición se recoge en la Tabla 22.

Tabla 22 Composición en g/l del medio de cultivo listo para su uso Agar Listeria según Otaviani y Agosti (ALOA)

Digesto enzimático de tejido animal	18
Digesto enzimático de caseína	6
Extracto de levadura	10
Piruvato sódico	2
Glucosa	2
Glicerofosfato de magnesio	1
Sulfato de magnesio	0,5
Cloruro sódico	5
Cloruro de litio	10
Fosfato disódico de hidrógeno anhidro	2,5
X-glucósido	0,05
Ácido nalidíxico	0,02
Cftazidima	0,02
Polimixina B	76700 U
Anfotericina B	0,01
Fosfatidilinositol	2
Agar	13,5

- Kit VIDAS® LMO2 para confirmación de *Listeria monocytogenes* compuesto por: cartuchos LMO2, conos SPR® LMO2, estándar LMO2, control positivo LMO2 y control negativo LMO2.

Material.

- Asas de siembra de platino y de picadura.
- Pipetas de capacidad nominal de 1 ml., graduadas en divisiones de 0,1 ml. y con una tolerancia de $\pm 2 \%$.
- Estufa de cultivo MEMMERT® ajustada a $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Equipo de recuento de colonias, consistente en una base iluminada con un fondo negro equipado con una lente de 1,5 aumentos y un contador mecánico.
- Agitador excéntrico de tubos tipo vórtex.
- Equipo miniVIDAS® de bioMérieux®.

8.3 MATERIALES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR.

8.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Reactivos.

- Lysis buffer (Applied Biosystems™).
- Agua libre de ARN-asa.

Material.

- Campana de flujo laminar NUAIRE® de seguridad biológica nivel II.
- Agitador excéntrico de tubos tipo vórtex.
- PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit, utilizado para la extracción de ADN de *Salmonella* spp. y STEC.
- PrepSEQ™ Rapid Spin Bead-Beating Sample Prep Kit, utilizado para la extracción de ADN de *Listeria monocytogenes*.
- Termobloque con capacidad de alcanzar $99,9 \pm 1$ °C.
- Microcentrífuga.
- Pipetas automáticas con capacidades de 1-10 µl., 10-100 µl. y 100-1000 µl.

8.3.2. INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. MEDIANTE REAL TIME PCR.

Reactivos.

- ADN extraído según el punto 8.6.1.
- MicroSEQ® *Salmonella* spp. detection kit.
- Agua libre de ARN-asa.
- Control Positivo Externo (cepa *Salmonella enteritidis* NCTC6676)

Material.

- Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System
- Centrífuga para placas.
- Agitador excéntrico de tubos tipo vórtex.
- Campana de flujo laminar de seguridad biológica nivel II.
- Pipeta automática con capacidad 10-100 µl.

8.3.3. INVESTIGACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE REAL TIME PCR.

Reactivos.

- ADN extraído según el punto 8.6.1.
- MicroSEQ® *Listeria monocytogenes* detection kit.
- Agua libre de ARN-asa.
- Control Positivo Externo (cepa *Listeria monocytogenes* NCTC11994)

Material.

- Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System
- Centrífuga para placas.
- Agitador excéntrico de tubos tipo vórtex.
- Campana de flujo laminar de seguridad biológica nivel II.
- Pipeta automática con capacidad 10-100 µl.

8.3.4. INVESTIGACIÓN DE STEC MEDIANTE REAL TIME PCR.

Reactivos.

- ADN extraído según el punto 8.6.1.
- Custom TaqMan ISO STEC Screening Assay (Thermo Scientific™).
- Agua libre de ARN-asa.
- Control Positivo Externo (cepa *E. coli* O157:H7 NCTC12900)

Material.

- Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System
- Centrífuga para placas.
- Agitador excéntrico de tubos tipo vórtex.
- Campana de flujo laminar de seguridad biológica nivel II.
- Pipeta automática con capacidad 10-100 µl.

8.4. MATERIALES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE MACRONUTRIENTES.

8.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA INICIAL.

- Cuchara de acero inoxidable.
- Pinzas quirúrgicas.
- Cuchillo.
- Trituradora eléctrica.
- Cápsulas de porcelana.
- Tamiz con tamaño de partícula menor o igual a 1 mm.
- Termómetro.

8.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE VOLUMETRÍA (MÉTODO KJELDAHL).

Reactivos.

- Reactivo Kjeldahl (Cu-Se).
- Ácido sulfúrico al 98 %.
- Hidróxido sódico al 32 % (m – m).
- Ácido bórico al 4 % para análisis volumétrico.
- Indicador Shiro-Tashiro.

- Ácido clorhídrico 0,1 N.

Material

- Balanza analítica marca SARTORIUS®, con una resolución de 0,0001 g y una tolerancia de $\pm 0,01$ g.
- Pipeta de capacidad nominal de 10 ml. graduada en divisiones de 0,5 ml. con una tolerancia de ± 2 %.
- Unidad digestora BUCHI® K-436.
- Unidad destiladora BUCHI® B-234.
- Bureta digital con precisión de 0,01 ml.

8.4.3. DETERMINACIÓN DE GRASAS POR GRAVIMETRÍA (MÉTODO SOXHLET)

Reactivos

- Eter petróleo 99 %.
- Ácido clorhídrico 3N.

Material

- Cápsula de vidrio.
- Unidad de extracción SOXTEC® System HT 1043.
- Unidad de servicio SOXTEC® System HT 1047.
- Unidad de hidrólisis SoxCap® 2047 con placa de calentamiento 2022 y accesorios.
- Filtro Foss®
- Vaso de aluminio
- Estufas marca SELECTA® reguladas a 60 ± 2 °C y 103 ± 2 °C.
- Balanza analítica marca SARTORIUS®, con una resolución de 0,001 g y una tolerancia de $\pm 0,01$ g.
- pHmetro con resolución 0,01

8.4.4. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD POR GRAVIMETRÍA

Reactivos

- Etanol 98 %.
- Arena de mar lavada para ensayos.

Material

- Cápsulas de porcelana.
- Varillas de vidrio.
- Estufa marca SELECTA® regulada a 103 ± 2 °C.
- Balanza analítica marca SARTORIUS®, con una resolución de 0,001 g y una tolerancia de $\pm 0,01$ g.

8.4.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS POR GRAVIMETRÍA

- Crisoles de porcelana.
- Mufla.
- Balanza analítica marca SARTORIUS®, con una resolución de 0,001 g y una tolerancia de $\pm 0,01$ g.

8.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

8.5.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA INICIAL.

Pesar, en un recipiente estéril o en una bolsa de plástico estéril una masa de 25 g., que sean representativos de la muestra de ensayo, con una precisión del $\pm 5 \%$.

Añadir una cantidad de agua de peptona tamponada igual a 9 veces la masa de la muestra. Esta cantidad se determinará preferiblemente en relación a la masa con una precisión del $\pm 5 \%$.

Homogeneizar durante un tiempo no inferior a 30 s. ni superior a 2,5 minutos.

Para evitar que los microorganismos resultasen dañados por cambios bruscos de temperatura, la temperatura del disolvente durante las operaciones indicadas más adelante deberá ser aproximadamente la misma que la temperatura del entorno.

Se han realizado diluciones decimales siguiendo el siguiente procedimiento:

Introducir, utilizando una pipeta, 1 ml. de la suspensión inicial (con una precisión) del $\pm 5 \%$ en un tubo que contenga 9 ml. de disolvente estéril a la temperatura adecuada.

Para conseguir una precisión óptima, no deberán introducirse las pipetas más de 1 cm. dentro de la suspensión inicial.

Evitar todo tipo de contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el disolvente estéril.

Mezclar exhaustivamente entre 5 s y 10 s, para obtener una dilución 10^{-2} .

Si es necesario repetir estas operaciones utilizando la dilución de 10^{-2} y las diluciones sucesivas utilizando una pipeta estéril nueva en cada paso de dilución, obteniéndose las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , etc., hasta que el número de

microorganismos que se esperase obtener no excediese el límite superior de recuento del equipo automatizado.

8.5.2. RECuento DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

Preparación de una dilución 1/400 en el caso de TEMPO® TVC y de 1/40 en el resto de microorganismos. Se realizaron cuatro diluciones (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) a partir de la bolsa inicial, preparada según el punto 4.2.1.3, de cada muestra para evitar que el recuento excediese del límite superior del aparato. Este límite es de $4,9 \times 10^5$ ufc/g para aerobios mesófilos totales y $4,9 \times 10^4$ ufc/g para el resto de microorganismos. Gracias a estas diluciones el rango de recuento fue de $100 - 4,9 \times 10^9$ ufc/g en el caso de aerobios mesófilos totales y de $10 - 4,9 \times 10^8$ ufc/g en el resto de microorganismos.

Regular a 3 y 3,9 ml. respectivamente cada uno de los dosificadores que contienen el diluyente secundario y cebar la bomba eliminando los dos primeros volúmenes a distribuir.

Iniciar la sesión en la estación de preparación del sistema TEMPO® e identificar la muestra.

Reconstituir el medio de cultivo mediante el dosificador distribuyendo 3,9 ml. en el caso de TEMPO® TVC y 3 ml. en el resto de medios de cultivo.

Mediante una pipeta estéril, succionar de la bolsa o tubo de ensayo 0,1 ml. en el caso de TEMPO® TVC y 1 ml. en el resto de medios de cultivo y transferirlo al frasco que contiene el medio de cultivo reconstituido.

Homogeneizar durante 5 segundos utilizando un mezclador tipo vórtex. Los 4 ml. de medio inoculado corresponden a una dilución 1/400 en el caso de TEMPO® TVC y a una dilución 1/40 en el resto de microorganismos.

Retirar una tarjeta por cada frasco de medio inoculado sin tocar la punta del tubo de transferencia. Asociar el identificador de la muestra a ensayar con los códigos de barras del medio inoculado y la tarjeta correspondiente mediante el lector de código de barras.

Poner el frasco que contiene el medio inoculado en la gradilla de llenado. Insertar la tarjeta en la ranura frente al frasco, introduciendo el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del frasco. La gradilla puede alojar 6 frascos con sus tarjetas y permite el llenado simultáneo de 1 – 6 tarjetas del sistema TEMPO®.

Insertar la gradilla en la unidad de llenado TEMPO® Filler y comenzar el ciclo de llenado. Al finalizarlo, dicha unidad corta y sella los tubos de transferencia.

Retirar las tarjetas de la gradilla de llenado y colocarlas en las gradillas de incubación. Las tarjetas se deben insertar en las ranuras, con sus etiquetas de cara al usuario (hacia el asa de la gradilla). Las tarjetas a incubar a la misma temperatura deberán agruparse juntas en la misma gradilla.

Incubar las tarjetas a la temperatura y durante el tiempo establecido en la Tabla 23 dependiendo del tipo de microorganismo.

Tabla 23 Temperaturas y tiempos de incubación de los microorganismos indicadores de calidad microbiológica

Microorganismo	Temperatura	Tiempo
Aerobios mesófilos totales	30 ± 1 °C	40-48 h.
Enterobacterias	35 ± 1 °C	22-27 h.
Coliformes totales	30 ± 1 °C	24-27 h.
<i>Escherichia coli</i> β-glucoronidasa positivo	37 ± 1 °C	24-27 h.
Estafilococos coagulasa positivos	37 ± 1 °C	24-27 h.

8.5.3. INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. MEDIANTE MÉTODO AUTOMATIZADO.

Tras preparar la dilución inicial según el punto 8.5.1., se procede al preenriquecimiento de la muestra.

Incubar durante 22 ± 4 h. a 37 ± 1 °C.

Tras la incubación, transferir 0,1 ml. de la suspensión a 10 ml. de caldo SX2[®] para enriquecer la muestra.

Incubar durante 24 ± 2 horas a $41,5 \pm 1$ °C.

Homogenizar en un agitador tipo vórtex el caldo SX2[®] durante 10 segundos.

Utilizar un cartucho SLM y un SPR[®] SLM por cada muestra, control o estándar a analizar. El test es identificado en el equipo por las siglas “SLM”.

Transferir 0,5 ml. del caldo SX2[®] al pocillo para la muestra del cartucho VIDAS[®].

Calentar durante 15 ± 1 minutos según las instrucciones de VIDAS[®] Heat & Go, y dejar enfriar durante 10 minutos.

Realizar el test VIDAS[®].

En aquellas muestras que resulten positivas, se continúa la confirmación mediante microbiología tradicional.

8.5.4. MÉTODO HORIZONTAL DE CONFIRMACIÓN DE POSITIVOS A *SALMONELLA* SPP.

Por cada tubo positivo de caldo SX2[®], sembrar por agotamiento con un asa de platino la superficie de dos placas de agar XLD y de agar Hektoen.

Incubar las placas durante 24 ± 3 h a 37 ± 1 °C.

Examinar las placas después de una incubación de 24 ± 3 h, con el fin de buscar la presencia de colonias típicas de *Salmonella* las cuales responden a las siguientes características:

- Agar XLD: Tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador.
- Agar Hektoen: Aparecen de color azul o azul-verdoso con o sin centros negros. Algunas *Salmonellae* pueden dar amplios centros negros e incluso aparecer como colonias completamente negras.

Para realizar la confirmación bioquímica, sembrar e inocular con el asa de picadura, al menos 5 colonias sospechosas, salvo que existan menos de cinco en cuyo caso se tomarán las que haya. Sin flamear entre cada medio, sembrar en este orden:

- Agar urea: en la superficie.
- Agar TSI: en profundidad y en superficie.
- Agar nutritivo: en estría apretada.

Incubar a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas los tubos.

Se toma con un asa, bien cargada, colonias del agar nutritivo procedente, sólo de las colonias que hayan dado el resultado correcto en las pruebas bioquímicas, (ureasa negativas, formación de gas y SH_2 y fermentación de la glucosa y no de la lactosa) de los medios (TSI y agar urea) y se inocular en un tubo que contiene 5 ml de agua destilada estéril. Comprobar que aparece turbidez patente en el agua, después de la homogeneización, inocular la tira API® 20E con una pipeta estéril.

Preparación e interpretación de la tira API® 20E según las instrucciones del fabricante.

8.5.5. MÉTODO HORIZONTAL DE RECuento EN PLACA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

Tras la preparación de la dilución inicial según el punto 8.5.1., se deja reposar durante 1 h. \pm 5 minutos a 20 ± 2 °C en la estufa.

Sembrar 0,1 ml. en 2 placas por extensión en la superficie.

Dejar las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la absorción del inóculo.

Incubar a 37 ± 1 °C. El recuento final se obtiene a las 48 h. \pm 2 h. No obstante, puede realizarse una lectura preliminar a las 24 h. \pm 2 h. para detectar muestras muy contaminadas más rápidamente.

Para confirmar que las colonias típicas azul – verdosas con halo opalescente pertenecen a *Listeria monocytogenes* y no a *Listeria ivanovii*, debemos preparar una suspensión en 2 ml. de solución salina de peptona con una colonia típica (aislada o no).

Transferir 0,5 ml. de esta suspensión en el pocillo para la muestra del cartucho VIDAS LMO2 y realizar el test VIDAS®. Un resultado positivo confirma la presencia de *L. monocytogenes*.

8.6 MÉTODO UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR.

8.6.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Procedimiento de extracción de ADN para investigación de *Salmonella* spp. y cribado de STEC.

Tras preparar la dilución inicial según el punto 4.2.1.4, incubar la bolsa a 37 ± 1 °C de 18 a 24 h.

Introducir la columna de filtrado en un tubo Eppendorf® y añadir 750 µl. de la muestra incubada en la columna de filtrado.

Centrifugar los tubos de 12.000 a 16.000 g durante 3 minutos.

Desechar la columna de filtrado. Acto seguido, aspirar y descartar el sobrenadante teniendo precaución de no alterar el pellet.

Añadir 50 µl de Lysis Buffer al pellet y agitar en un vórtex durante 10 segundos o hasta resuspensión del pellet.

Incubar los tubos Eppendorf® en el termobloque a 97 ± 2 °C durante 12 ± 2 minutos.

Atemperar las muestras a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 minutos.

Centrifugar los tubos a 12.000 a 16.000 g durante un minuto.

Añadir 250 µl. de agua ultra pura estéril y agitar en un vórtex durante 10 segundos o hasta resuspensión del pellet.

Centrifugar a 12.000 a 16.000 g durante 2 minutos.

Aspirar y guardar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf®. Es el ADN extraído. Realizar una dilución 1:10 al ADN extraído.

Procedimiento de extracción de ADN para investigación de *Listeria monocytogenes*.

Tras preparar la dilución inicial según el punto 4.2.1.4, incubar la bolsa a 37 ± 1 °C de 18 a 24 h.

Introducir la columna de filtrado en un tubo Eppendorf® con esferas de zirconio.

Añadir 750 µl. de la muestra incubada en la columna de filtrado.

Centrifugar los tubos de 12.000 a 16.000 g durante 3 minutos.

Desechar la columna de filtrado. Acto seguido, aspirar y descartar el sobrenadante.

Añadir 500 µl de agua ultra pura estéril y resuspender el pellet de bacterias y esferas de zirconio durante 5 segundos en un vórtex.

Centrifugar los tubos a de 12.000 a 16.000 g durante 3 minutos.

Aspirar y descartar el sobrenadante teniendo precaución de no alterar el pellet compuesto por microorganismos y esferas de zirconio.

Añadir 50 µl. de Lysis Buffer al pellet y agitar en un vórtex durante 5 minutos.

Incubar los tubos Eppendorf® en el termobloque a 97 ± 2 °C durante 12 minutos.

Atemperar las muestras a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Centrifugar los tubos de 12.000 a 16.000 g durante un minuto.

Añadir 250 µl. de agua ultra pura y agitar en un vórtex durante 30 segundos.

Centrifugar de 12.000 a 16.000 g durante 2 minutos.

Aspirar y guardar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf®. Es el ADN extraído. Realizar una dilución 1:10 al ADN extraído.

8.6.2. INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. MEDIANTE REAL TIME PCR.

Añadir 30 µl. de ADN de cada muestra según la extracción del punto 8.6.1. a cada pocillo.

Añadir 30 µl. del agua libre de ARN-asa al pocillo identificado como control negativo.

Añadir 30 µl. del ADN del control positivo externo en el pocillo identificado como tal.

Sellar los tubos con las tiras ópticas transparentes incluidas en el kit MicroSEQ® *Salmonella* spp. detection kit (Thermo Scientific™).

Agitar durante 5 segundos en un agitador tipo vórtex.

Centrifugar la placa a 200 g durante 10 segundos.

Colocar los tubos en el termociclador Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System y comenzar el ensayo.

Las condiciones de PCR han sido las siguientes:

- Desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C.
- 40 ciclos de 3 segundos de desnaturalización a 95 °C y 30 segundos de hibridación y extensión a 60°C.

El criterio para determinar si una muestra es positiva o negativa es el siguiente:

- Positiva: la amplificación de la sonda de *Salmonella* spp. supera el umbral antes del fin del ciclo 40.
- Negativa: no se produce amplificación de la sonda de *Salmonella* spp. y la amplificación de la sonda del *Internal Positive Control* (IPC) supera el umbral antes del ciclo 40.

8.6.3. INVESTIGACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE REAL TIME PCR.

Añadir 30 µl. de ADN de cada muestra según la extracción del punto 8.6.1. a cada pocillo.

Añadir 30 µl. del agua libre de ARN-asa al pocillo identificado como control negativo.

Añadir 30 µl. del ADN del control positivo externo en el pocillo así identificado.

Sellar los tubos con las tiras ópticas transparentes incluidas en el kit MicroSEQ® *Listeria monocytogenes* detection kit (Thermo Scientific™).

Agitar durante 5 segundos en un agitador tipo vórtex.

Centrifugar la placa a 200 g durante 10 segundos.

Colocar los tubos en el termociclador Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System y comenzar el ensayo.

Las condiciones de PCR han sido las siguientes:

- Desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C.
- 40 ciclos de 3 segundos de desnaturalización a 95 °C y 30 segundos de hibridación y extensión a 60 °C.

El criterio para determinar si una muestra es positiva o negativa es el siguiente:

- Positiva: la amplificación de la sonda de *Listeria monocytogenes* supera el umbral antes del fin del ciclo 36,7.
- Negativa: no se produce amplificación de la sonda de *Listeria monocytogenes* y la amplificación de la sonda del IPC supera el umbral antes del fin del ciclo 40.

8.6.4. INVESTIGACIÓN DE STEC MEDIANTE REAL TIME PCR.

Añadir 30 µl. de ADN de cada muestra según la extracción del punto 8.6.1. a cada pocillo.

Añadir 30 µl. del agua libre de ARN-asa al pocillo identificado como control negativo.

Añadir 30 µl. del AND del control positivo externo en el pocillo identificado como tal.

Sellar los tubos con las tiras ópticas transparentes incluidas en el kit Custom TaqMan ISO STEC Screening Assay (Thermo Scientific™).

Agitar durante 5 segundos en un agitador tipo vórtex.

Centrifugar la placa a 200 *g* durante 10 segundos.

Colocar los tubos en el termociclador Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System y comenzar el ensayo.

Las condiciones de PCR han sido las siguientes:

- Desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C.
- 40 ciclos de 3 segundos de desnaturalización a 95 °C y 30 segundos de hibridación y extensión a 60°C.

El criterio para determinar si una muestra es presunta positiva o negativa es el siguiente:

- Presunto positivo: La amplificación del gen *O157* y/o *Stx1/2* debe superar el umbral antes del ciclo 40.
- Negativo: No se produce amplificación de ningún gen o únicamente se produce amplificación del gen *eae* por encima del umbral antes del ciclo 40.

8.7. MÉTODO UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS DE MACRONUTRIENTES.

8.7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA INICIAL.

Realizar un troceado en una cápsula de porcelana con un cuchillo hasta obtener trozos de 1 cm.

Triturar en hasta conseguir una consistencia pastosa con un tamaño de partícula igual o inferior a 1 mm. Este tamaño de partícula se comprueba con un tamiz sobre cinco alícuotas tomadas aleatoriamente.

La temperatura al final del proceso de triturado no debe superar los 24 °C.

Trasvasar la muestra homogenizada a un recipiente de plástico de cierre hermético de 150 ml. de capacidad de forma que quede lleno, para evitar pérdidas de humedad o cualquier cambio en su composición.

8.7.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE VOLUMETRÍA (MÉTODO KJELDAHL).

Pesar en un pesasustancias entre 0,4 y 0,6 g. de muestra preparada según el punto 8.7.1. y depositar en el tubo de destilación correspondiente, junto con una tableta de catalizador Kjeldahl (Cu-Se).

Añadir 15 ml. de ácido sulfúrico y colocar los tubos en el digestor BUCHI® K-436. Tapar con la pieza colectora y la sujetarla con las pinzas.

Mantener en ebullición durante 75 ± 2 min. Comprobar que el líquido adquiere un aspecto transparente con ligero tono verde-azulado claro.

Tras retirar los tubos del digestor, añadimos $60 \pm 0,5$ ml. de agua destilada. En el caso de que haya sulfato de potasio cristalizado, se disuelve mediante agitación suave.

Adicionar 10 gotas de Shiro-Tashiro en tantos matraces Erlenmeyer como tubos de destilación se hayan procesado.

Realizar la destilación automática en el destilador BUCHI® B-324.

Valoramos el contenido del matraz Erlenmeyer utilizando la bureta digital hasta el punto de viraje (cuando la disolución adquiera un color violeta incipiente) con ácido clorhídrico 0,1 N.

Además de realizar los análisis de todas las muestras, debemos realizar todos los pasos con un blanco.

El contenido de nitrógeno de la muestra, expresado como porcentaje en masa, se obtiene aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno (g/100 g de muestra)} = 0,0014 \times f \times (V_1 - V_0) \times \frac{100}{M}$$

V_0 : volumen en ml. de ácido clorhídrico gastado en la valoración del blanco.

V_1 : volumen en ml. de ácido clorhídrico gastado en la valoración de la muestra.

M: masa en g. de la muestra

f: factor de la disolución de ácido clorhídrico (en nuestro caso 0,1 N)

El porcentaje en peso de proteína se obtiene multiplicando el contenido de nitrógeno por el factor de 6,25.

8.7.3. DETERMINACIÓN DE GRASAS TOTALES POR GRAVIMETRÍA (MÉTODO SOXHLET).

HIDRÓLISIS ÁCIDA.

Pesar de 1 a 2 g. de muestra preparada según el punto 8.7.1. con una precisión de 0,1 mg. en la cápsula de vidrio con filtro FOSS®.

Añadir entre 900 y 1000 ml. de ácido clorhídrico dentro del vaso de extracción de tal manera que la parte inferior del carrusel estará dentro del ácido.

Colocar el vaso de extracción sobre la placa caliente y tapar con el condensador.

Mantener 60 minutos en ebullición. Una vez que cese la ebullición, retirar el ácido clorhídrico del vaso de extracción.

Lavar las cápsulas de vidrio hasta que el pH del agua de lavado se sitúe entre 6,5 y 7.

Secar las cápsulas de vidrio junto con el filtro FOSS® en la estufa a 60 ± 2 °C durante toda la noche.

EXTRACCIÓN.

Ajustar los adaptadores (arandelas metálicas) a las cápsulas de vidrio y colocarlos en la unidad de extracción SOXTEC® SYSTEM HT 1043, el cual ha sido encendido previamente hasta alcanzar entre 108 y 112 °C.

Es importante que el selector de posición en los lugares donde se van a introducir las cápsulas de vidrio se encuentre en la posición de “rinsing”.

Colocamos el crisol junto con el adaptador en la parte inferior del condensador de la unidad de extracción SOXTEC® SYSTEM HT 1043. Desplazando el selector de posición desde “rinsing” hasta “boiling”, conseguimos la fijación del crisol y el adaptador, gracias a un imán. El paso final consiste en cambiar nuevamente el selector hasta la posición “rinsing” (ello conllevará el desplazamiento vertical del crisol de vidrio).

Desecar los vasos de extracción a 103 ± 2 °C durante $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$. Enfriar a temperatura ambiente en el desecador durante $40 \pm 5 \text{ min}$ y pesar con una aproximación de 0,1 mg.

Añadimos de 25 a 50 ml. de éter de petróleo a cada vaso de extracción. Los introducimos en la parte inferior del condensador y bajamos la palanca de ajuste. Los vasos de extracción quedarán sujetos en los condensadores.

Mover el selector de posición a la posición “boiling” (ello sumergirá los crisoles en el disolvente de los vasos de extracción) y hervir durante 20 min. Es importante asegurarse que las llaves de los condensadores se encuentran abiertas (posición vertical).

Cambiar el selector de posición nuevamente hasta la posición “rinsing” y lo mantener durante 40 min.

Cerrar las válvulas de los condensadores colocando las llaves en posición horizontal.

Tras recolectar casi todo el disolvente, pulsar el botón “AIR” de la unidad de servicio SOXTEC® SYSTEM HT 1046 y accionar la palanca a la posición “EVAPORATION” de la unidad de extracción SOXTEC® SYSTEM HT 1043. Lo mantenemos en esta posición durante 10-15 min.

Transcurrido ese tiempo, accionar nuevamente la palanca “EVAPORATION”, liberar los vasos de extracción con la palanca de ajuste.

Eliminar el resto del disolvente contenido en el vaso de extracción en la estufa de desecación a 103 ± 2 °C durante 30 minutos.

Tras enfriar los vasos de extracción con la grasa extraída dentro de un desecador durante $40 \pm 5 \text{ min}$ a temperatura ambiente, pesar con una aproximación de 0,1 mg.

Para liberar las cápsulas de vidrio con la muestra desengrasada, desplazar el selector de posición hasta “boiling” y retirarlas.

El contenido graso de la muestra, expresado como porcentaje en masa, se obtiene aplicando la fórmula:

M_0 : masa, en gramos, de la muestra.

$$\% \text{ Contenido graso (g/100 g de muestra)} = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100$$

M_1 : masa, en gramos, del vaso de extracción después de la desecación en estufa.

M_2 : masa, en gramos, del vaso de extracción con la grasa después de la desecación en estufa.

8.7.4. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD POR GRAVIMETRÍA.

Llenar la cápsula de porcelana con una cantidad de arena de mar de tres a cuatro veces la masa de la muestra del ensayo.

Desecar en la estufa a 103 ± 2 °C junto con la varilla de vidrio durante 40 ± 5 min.

Tras dejar que se enfríen a temperatura ambiente las cápsulas de porcelana durante 40 ± 5 min. en el desecador, pesar la cápsula, la varilla de vidrio y la arena de mar.

Colocar de 5 a 8 g. de la muestra homogeneizada según el punto 8.7.1. en la cápsula y pesar de nuevo la cápsula junto con la alícuota.

Añadir de 5 a 10 ml. de etanol para facilitar la mezcla de la muestra con la arena de mar.

Introducir la cápsula junto con la muestra en la estufa a 103 ± 2 °C durante 22 ± 1 h.

Tras retirar la cápsula de la estufa, se deja enfriar en el desecador durante 40 ± 5 min., se vuelve a pesar.

El contenido de humedad de la muestra, expresado como porcentaje en masa, se obtiene aplicando la fórmula:

M_0 : masa, en gramos, de la cápsula de porcelana, varilla de vidrio y arena.

$$\% \text{ Humedad (g/100 g de muestra)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

M_1 : masa, en gramos, de la cápsula de porcelana con muestra, varilla de vidrio y arena antes de la desecación.

M_2 : masa, en gramos, de la cápsula de porcelana con muestra, varilla de vidrio y arena después de la desecación.

8.7.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS POR GRAVIMETRÍA.

Tras calentar los crisoles en la mufla a 550 ± 10 °C, dejar enfriar a temperatura ambiente y pesarlos.

Pesar de 2 a 10 g. de la muestra preparada según el punto 8.7.1. junto con el crisol.

Introducir los crisoles conteniendo la muestra en la mufla. La temperatura inicial será de 100 °C. Subir la temperatura gradualmente hasta alcanzar 550 ± 10 °C. Mantener a ésta temperatura durante 8 h. Al día siguiente se examinan las cenizas comprobando que presentan un color blanco-grisáceo.

Sacar los crisoles del horno mufla evitando la pérdida de cenizas al transferir los crisoles al desecador y desde el desecador a la balanza analítica. Dejar enfriar los crisoles hasta temperatura ambiente durante 45 ± 5 min.

Pesar los crisoles y las cenizas.

El contenido de cenizas de la muestra, expresado como porcentaje en masa, se obtiene aplicando la fórmula:

M_0 : masa, en gramos, del crisol vacío.

$$\% \text{ Cenizas (g/100 g de muestra)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

M_1 : masa, en gramos, del crisol con la muestra.

M_2 : masa, en gramos, del crisol con las cenizas.

8.7.6. CÁLCULO DEL CONTENIDO CALÓRICO.

Hemos calculado el contenido calórico de cada muestra mediante los factores de Atwater, los cuales establecen que la metabolización de los diferentes macronutrientes genera los siguientes valores de energía:

- Cada gramo de proteínas genera 16,8 kJ netos.
- Cada gramo de grasas genera 37,7 kJ netos.

8.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Para realizar el análisis estadístico se han utilizado las siguientes variables:

8.8.1. VARIABLES DEPENDIENTES.

Como variables dependientes se han utilizado las variables cuantitativas que se recogen en la Tabla 24.

Tabla 24 Variables dependientes cuantitativas

Variable	Valor
Aerobios mesófilos totales	Log UFC/g
Enterobacterias	Log UFC/g
Coliformes totales	Log UFC/g
<i>E. coli</i> β -glucoronidasa positivo	Log UFC/g
Estafilococos coagulasa positivos	Log UFC/g
Contenido en proteína	% (m-m)
Contenido en grasa	% (m-m)
Humedad	% (m-m)
Cenizas	% (m-m)

Las variables dependientes cualitativas se recogen en la Tabla 25 con sus diferentes categorías Tabla 25.

Tabla 25 Variables dependientes cualitativas

Variable	Categorías
<i>Salmonella</i> spp. PCR	Presencia
	Ausencia
STEC	Presunto positivo
	Negativo
Gen <i>O157</i>	Presencia
	Ausencia
Gen <i>Stx 1/2</i>	Presencia
	Ausencia
Gen <i>eae</i>	Presencia
	Ausencia

8.8.2. VARIABLES INDEPENDIENTES.

Como variable independiente se ha utilizado la variable cualitativa “Tipo de derivado cárnico” con dos categorías; derivado cárnico de ciervo y derivado cárnico de jabalí.

8.8.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se ha tratado de determinar la asociación o independencia entre las variables cuantitativas dependientes y la variable independiente, por lo que el procedimiento utilizado ha sido comparar las medias de las distribuciones de la variable dependiente en las dos categorías de la variable independiente.

Estas prueban contrastan la hipótesis nula de que las medias de las distribuciones de la variable dependiente en cada una de las categorías de la variable independiente son iguales:

$$H_0 \longrightarrow \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 \longrightarrow \text{las medias son diferentes}$$

La aceptación de la hipótesis alternativa implica que existe asociación estadísticamente significativa entre la variable dependiente y la independiente.

VARIABLES DEPENDIENTES CUANTITATIVAS.

En primer lugar, se ha realizado el estudio de Normalidad de las variables independientes, mediante el test de contraste de normalidad de Shapiro-Wilk.

Dado que la variable independiente es dicotómica, se ha realizado la Comparación de Medias mediante el test estadístico t de Student en los casos que se cumplen los criterios de normalidad; en los casos que no se cumplen los criterios de normalidad se ha realizado la prueba no paramétrica Suma de Rangos de Wilcoxon o U de Mann-Whitney.

VARIABLES DEPENDIENTES CUALITATIVAS.

En el caso de las variables cualitativas dependientes, se ha tratado de determinar la asociación o independencia de la distribución de estas variables entre la variable independiente. Para ello se ha utilizado el test Ji-cuadrado de Pearson y en aquellos casos en los que no ha sido posible se ha utilizado la Prueba Exacta de Fischer.

Estas pruebas contrastan la hipótesis nula de que la distribución de la variable dependiente entre las diferentes categorías de las variables independientes es igual.

La aceptación de la hipótesis alternativa implica que existe asociación estadísticamente significativa entre la variable dependiente y la independiente.

Hemos asumido un error tipo α del 5% (p -valor $< 0,05$).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de análisis estadístico Stata/IC v.12.1 for Windows (32-bit).

8.9 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS RESULTADOS MICROBIÓLOGICOS OBTENIDOS Y LOS LÍMITES ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

Las especies domésticas de abasto más cercanas a las de nuestro estudio desde un punto de vista filogenético son el cerdo y la oveja (270,271).

Los límites microbiológicos que utilizaremos serán los recogidos en el Reglamento 1441/2007 (267), el cual se encuentra vigente a fecha de 23 de septiembre de 2016. En el Capítulo 1 del Anexo I del citado Reglamento se establecen los criterios de seguridad alimentaria, los cuales son vigentes durante toda la vida útil del producto.

En el Capítulo 2 del Anexo I del mismo Reglamento se establecen los criterios microbiológicos de higiene de los procesos. Es importante señalar que estos límites afectan única y exclusivamente al proceso productivo y el dejan de tener validez una vez que el producto ha abandonado la industria alimentaria que lo fabricó. A pesar de ello y, debido a la ausencia de límites microbiológicos para la carne de caza, hemos querido utilizarlos para evaluar el grado de higiene de las muestras.

8.10. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES ENTRE LAS ESPECIES DOMÉSTICAS DE ABASTO Y CINEGÉTICAS.

Como hemos visto en el punto anterior, utilizaremos como especies más cercanas a las de nuestro estudio el cerdo y la oveja.

Para realizar la comparación, hemos usado los valores publicados por Moreiras *et al.* (272) y aquellos disponibles en la base de datos de composición de alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*United States Department of Agriculture Food Composition Databases*) (273).

8.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El tratamiento, la comunicación y cesión de los datos de carácter personal de las entidades y/o personas participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 (274).

De acuerdo a lo que se establece en la legislación mencionada, los participantes podrán ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberán dirigirse al investigador principal.

Asimismo, de acuerdo a la Ley 14/2007 (275), los datos serán tratados con absoluta confidencialidad, de manera que será imposible asociar los resultados del estudio con los participantes.

La comunicación de datos y resultados a las entidades colaboradoras se realizará de forma que los datos de terceros aparezcan codificados.

9. RESULTADOS.

9.1. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

9.1.1. RESULTADOS: INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

Se ha realizado el análisis microbiológico a 62 de las 90 muestras; 31 a derivados cárnicos de ciervo y 31 a derivados cárnicos de jabalí.

Los resultados medios obtenidos tras el análisis de los indicadores de calidad microbiológica se encuentran resumidos en la Tabla 26.

Tabla 26 Valores medios de microorganismos indicadores de calidad microbiológica en derivados de carne de caza y según la especie cinegética

Microorganismo indicador	Derivados de carne de caza	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí
Aerobios mesófilos totales	7,1 (0,8)	7,2 (0,9)	7,1 (0,5)
Enterobacterias	4,9 (0,6)	5,1 (0,5)	4,6 (0,7)
Coliformes totales	4,6 (0,7)	4,9 (0,4)	4,4 (0,6)
<i>Escherichia coli</i> glucoronidasa positivos	4,5 (0,6)	4,7 (0,4)	4,2 (0,6)
Estafilococos coagulasa positivos	2,0 (0,9)	2,2 (1,0)	1,6 (0,9)

Entre paréntesis: desviación estándar.

Estos datos están representados en la Figura 8 de la página siguiente.

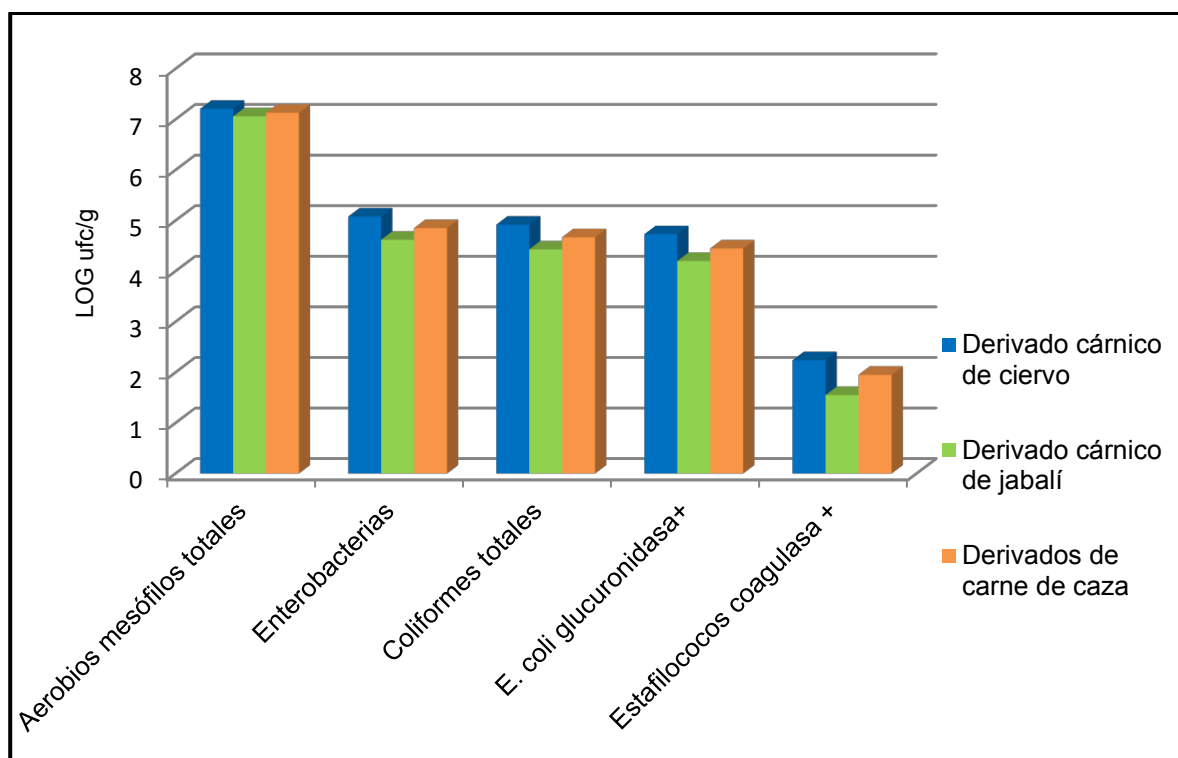


Figura 8 Valores medios de microorganismos indicadores de calidad microbiológica en derivados de carne de caza y según la especie cinegética

Vemos que el recuento de todos los microorganismos indicadores es más elevado en los derivados cárnicos de ciervo que en los derivados cárnicos de jabalí.

En el caso de los estafilococos coagulasa positivos, hemos obtenido 16 resultados por debajo del límite de detección del equipo (<10 ufc/g); 4 que corresponden a derivados cárnicos de ciervo y 12 a derivados cárnicos de jabalí. Estos resultados no están incluidos en los análisis estadísticos de los estafilococos coagulasa positivos.

En la Figura 9 podemos observar que la mediana (Rango Intercuartílico, RI en adelante) de los aerobios mesófilos totales es de 7,0 (RI 1,1) LOG ufc/g. En el caso de las enterobacterias la mediana es de 4,9 (RI 0,5) LOG ufc/g. La mediana de los coliformes totales es 4,8 (RI 0,6) LOG ufc/g. En el caso de los *E. coli* glucuronidasa positivos, la mediana obtenida es de 4,5 (RI 0,5) LOG ufc/g. la mediana del recuento de los estafilococos coagulasa positivos es de 1,7 (RI 1,3) LOG ufc/g.

Los valores están muy agrupados en enterobacterias, coliformes totales y *E. coli* glucuronidasa positivo. Los resultados de aerobios mesófilos totales son un poco más dispersos, algo que es habitual cuando se trata de recuentos altos. Los estafilococos coagulasa positivos presentan el rango intercuartílico mayor debido a resultados muy dispares. Vemos también que todos los indicadores presentan valores atípicos.

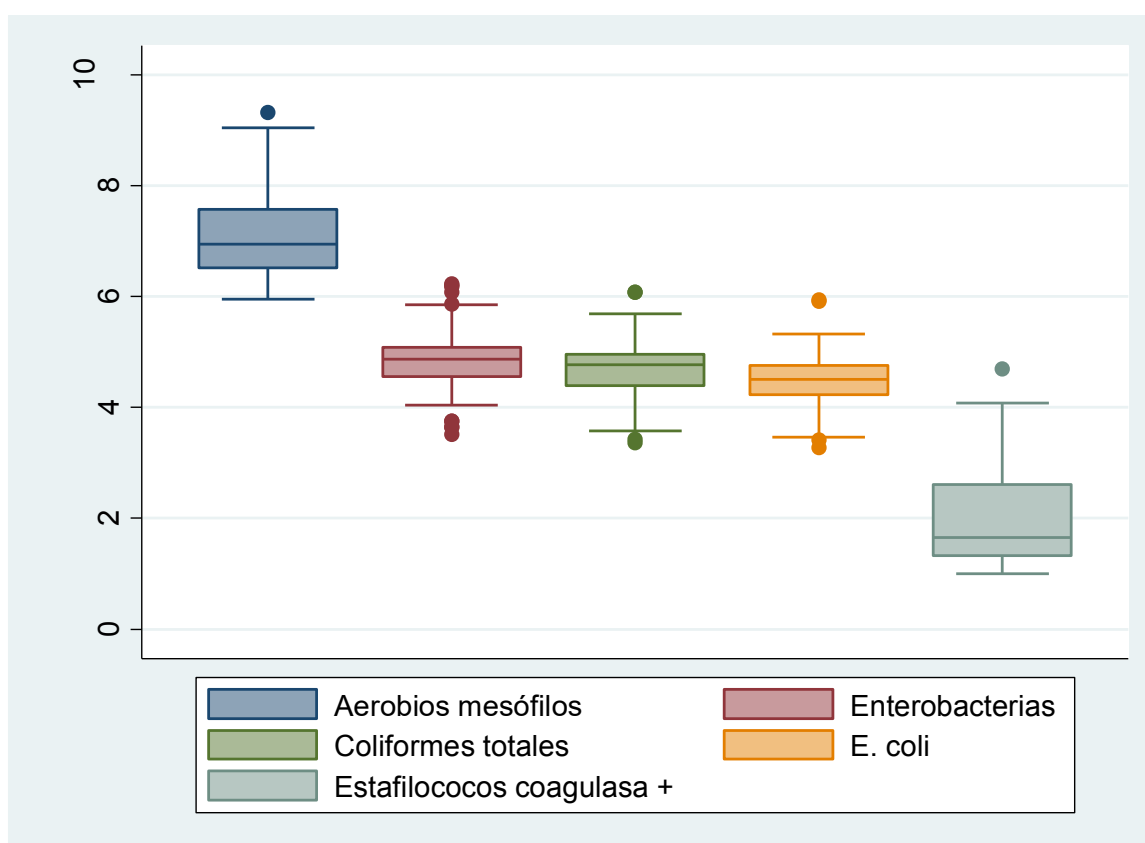


Figura 9 Distribución de los resultados de los indicadores de calidad microbiológica de derivados de carne de caza (LOG ufc/g)

Aerobios mesófilos totales.

Tras agrupar la distribución de los resultados obtenidos según la especie cinegética del derivado cárnico, la mediana del recuento de aerobios mesófilos totales ha sido de 7,2 (RI 0,7) LOG ufc/g en el caso de los derivados cárnicos de jabalí y de 6,9 (RI 1,5) LOG ufc/g en los derivados cárnicos de ciervo, como se puede observar en la Figura 10.

La dispersión de los resultados en los derivados cárnicos de ciervo provoca que el rango intercuartílico sea el doble que en el caso de los derivados cárnicos de jabalí. Vemos como una vez agrupados los resultados según la especie cinegética del derivado cárnico, no tenemos valores atípicos en este indicador microbiológico.

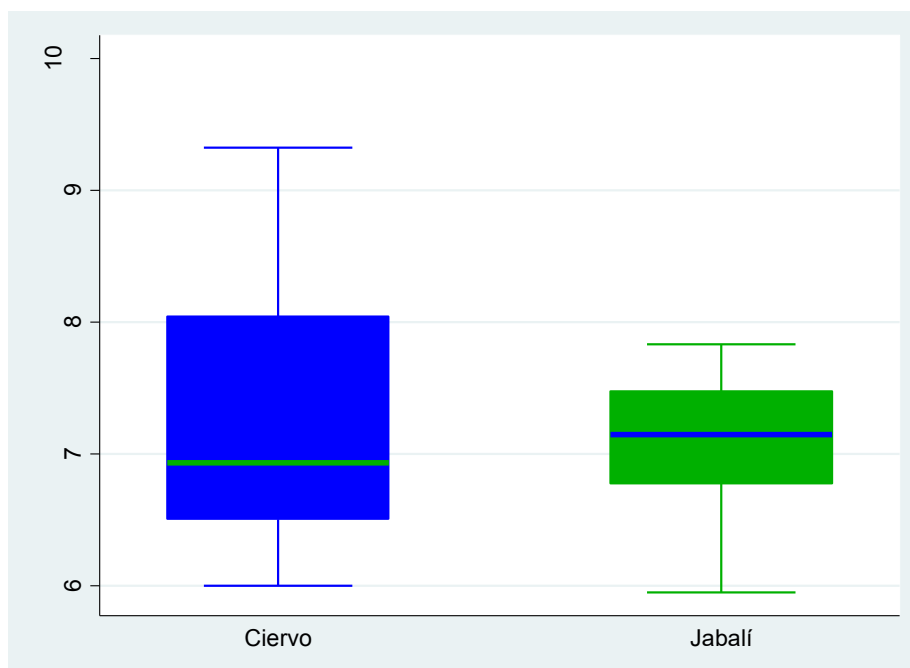


Figura 10 Distribución del recuento de aerobios mesófilos totales según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g)

Enterobacterias.

La mediana del recuento de enterobacterias en los derivados cárnicos de jabalí de 4,6 (RI 0,9) LOG ufc/g frente a 5,0 (RI 0,5) LOG ufc/g en los derivados cárnicos de ciervo (Figura 11).

La mayor dispersión de resultados se produce en los derivados cárnicos de jabalí aunque el valor de la mediana es menor.

Los únicos valores atípicos que aparecen son en los derivados cárnicos de ciervo y se han eliminado los valores atípicos inferiores que aparecían al no distribuir los resultados según la especie cinegética del derivado cárnico.

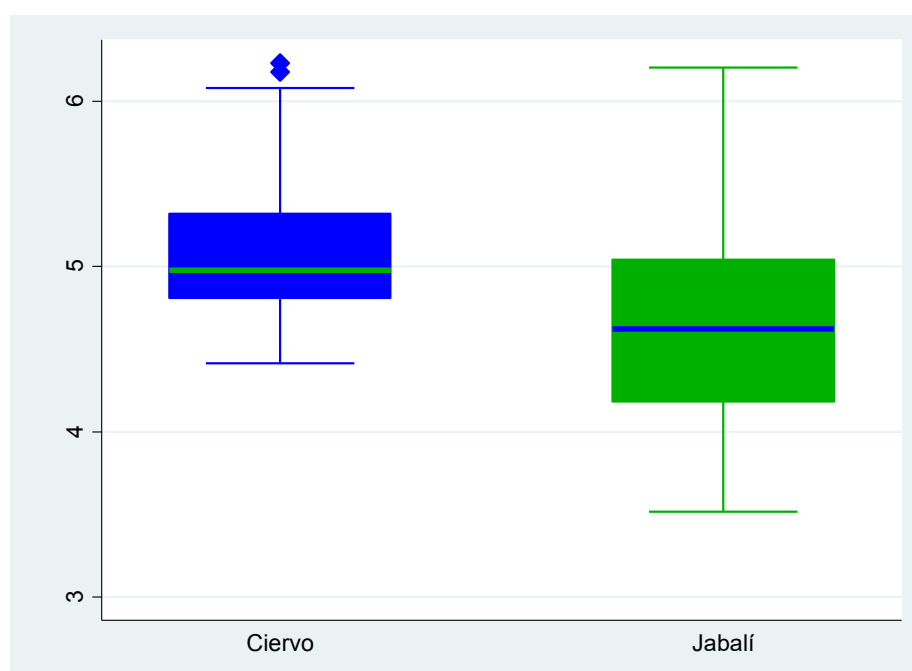


Figura 11 Distribución del recuento de enterobacterias según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g)

Coliformes totales.

En la Figura 12 se observa que la mediana del recuento de coliformes totales en los derivados cárnicos de jabalí es de 4,5 (RI 0,9) LOG ufc/g mientras que en los derivados cárnicos de ciervo es de 4,9 (RI 0,5) LOG ufc/g.

La dispersión de resultados en los derivados cárnicos de ciervo es menor, aunque la mediana es mayor. De hecho, se puede observar que prácticamente el bigote inferior casi coincide con la mediana de los derivados cárnicos de jabalí.

Los únicos valores atípicos se producen en los derivados cárnicos de ciervo.

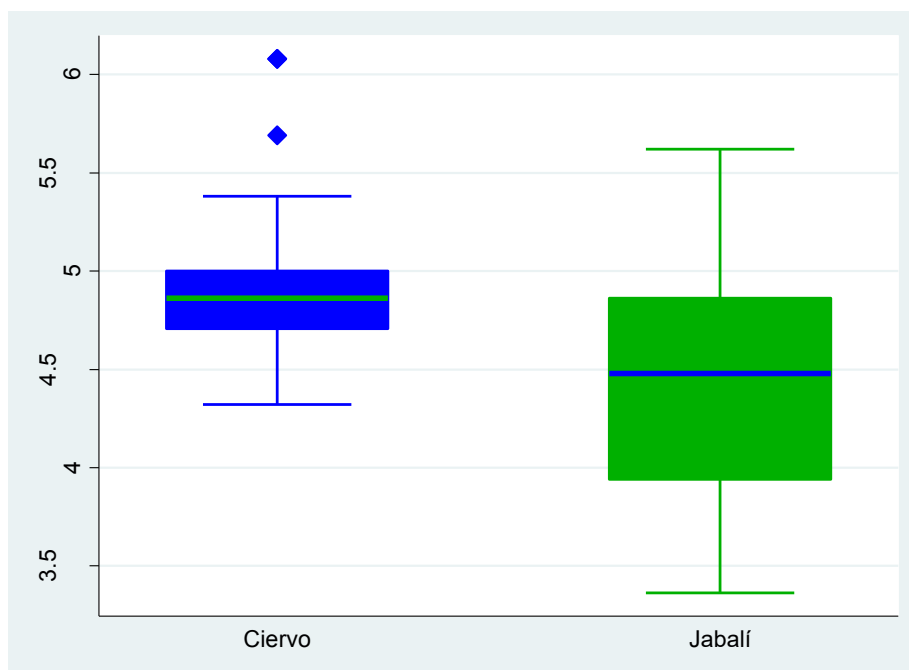


Figura 12 Distribución del recuento de coliformes totales según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g)

***E. coli* glucuronidasa positivos.**

Como podemos observar en la Figura 13, la mediana del recuento de *E. coli* glucuronidasa positivos en los derivados cárnicos de jabalí es de 4,3 (RI 0,9) LOG ufc/g frente a 4,6 (RI 0,4) LOG ufc/g obtenida en los derivados cárnicos de ciervo.

La dispersión de los resultados de los derivados cárnicos de jabalí prácticamente duplica la de los de ciervo. A pesar de ello, la mediana es menor y no aparecen valores atípicos. Los únicos que hemos encontrado corresponden con los derivados cárnicos de ciervo.

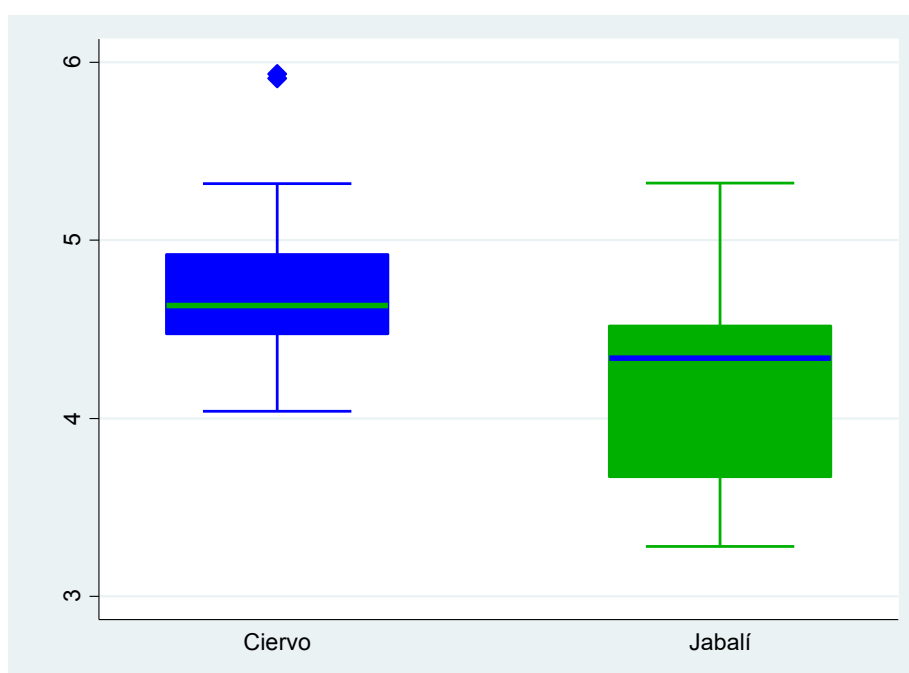


Figura 13 Distribución del recuento de *Escherichia coli* glucuronidasa positivos según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g)

Estafilococos coagulasa positivos.

En la Figura 14 se representa la distribución de los resultados válidos de estafilococos coagulasa positivos. La mediana de los derivados cárnicos de jabalí es de 1,5 (RI 0,9) LOG ufc/g mientras que la obtenida en los derivados cárnicos de ciervo es de 1,8 (RI 1,5) LOG ufc/g.

Los resultados más homogéneos son los correspondientes a los derivados cárnicos de jabalí. La mediana también es menor que la de ciervo e incluso el bigote superior se encuentra dentro del rango intercuartílico de los resultados de los derivados cárnicos de ciervo.

No hay valores atípicos al analizar los resultados según la especie cinegética.

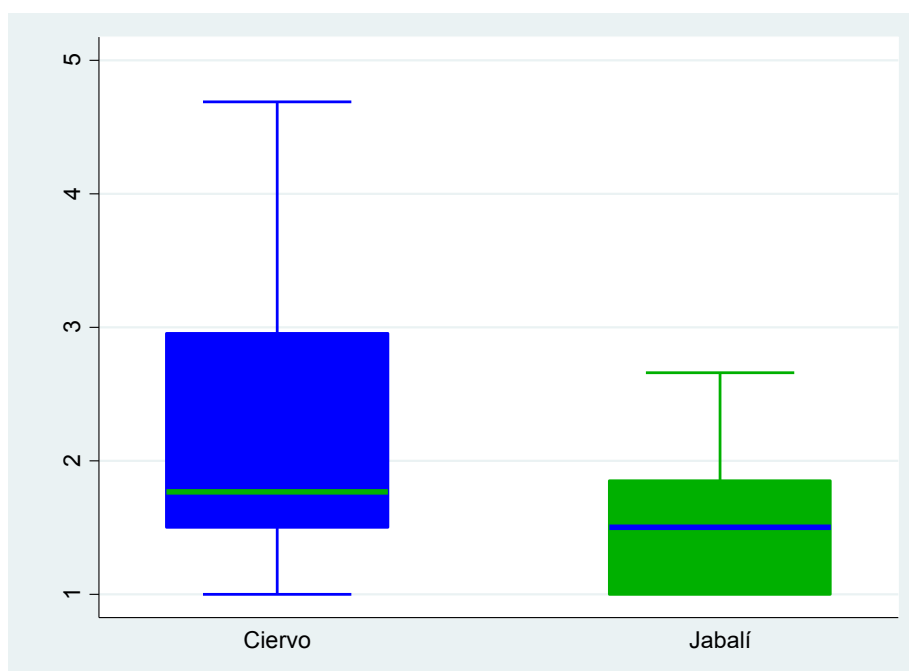


Figura 14 Distribución del recuento de estafilococos coagulasa positivos según la especie cinegética del derivado cárnico (LOG ufc/g)

9.1.2. RESULTADOS: INVESTIGACIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS.

Salmonella spp.

Como podemos observar en la Figura 15, se han obtenido un total de 11 positivos a *Salmonella* spp.; 10 correspondientes a preparados cárnicos de ciervo y uno a preparados cárnicos de jabalí. La prevalencia total resultante es 17,7 %. Si analizamos por separado cada especie, la prevalencia aumenta hasta un 32,3 % en el caso de los derivados cárnicos de ciervo. Por el contrario, en el caso de los derivados cárnicos de jabalí, disminuye hasta un 3,23 %.

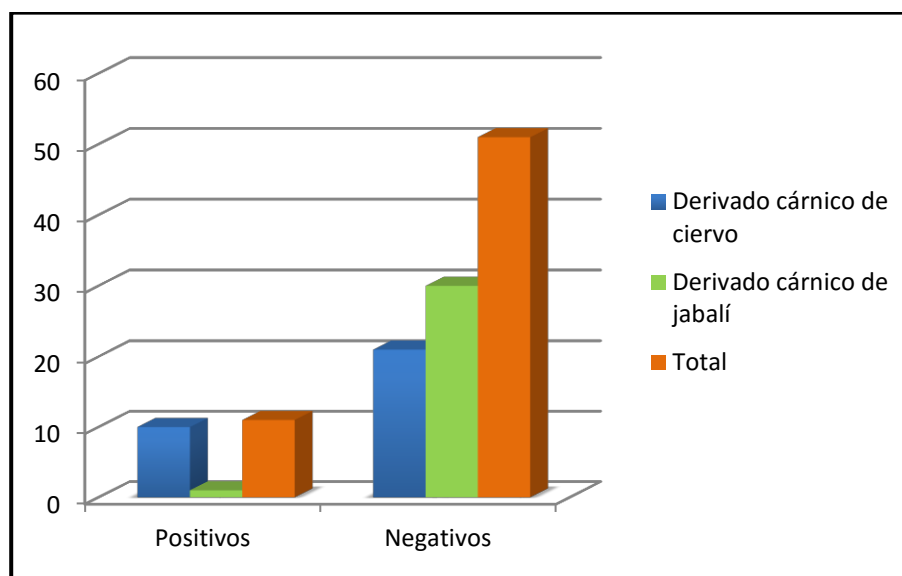


Figura 15 Resultados de la investigación de *Salmonella* spp. según el tipo de derivado cárnico

Listeria monocytogenes.

No se ha obtenido ningún resultado positivo a *Listeria monocytogenes* ni en los derivados cárnicos de ciervo ni en los de jabalí mediante ninguno de los dos métodos utilizados.

***Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC).**

Según se representa en la Figura 16, hemos obtenido un total de 18 muestras presuntas positivas a STEC; 16 de ellas corresponden a preparados cárnicos de ciervo y dos a preparados cárnicos de jabalí. La prevalencia de presuntos positivos de STEC es 29,0 %. Si analizamos cada especie por separado, los valores son de 51,6 % en el caso de los derivados cárnicos de ciervo y de 6,5 % en el caso de los derivados cárnicos de jabalí.

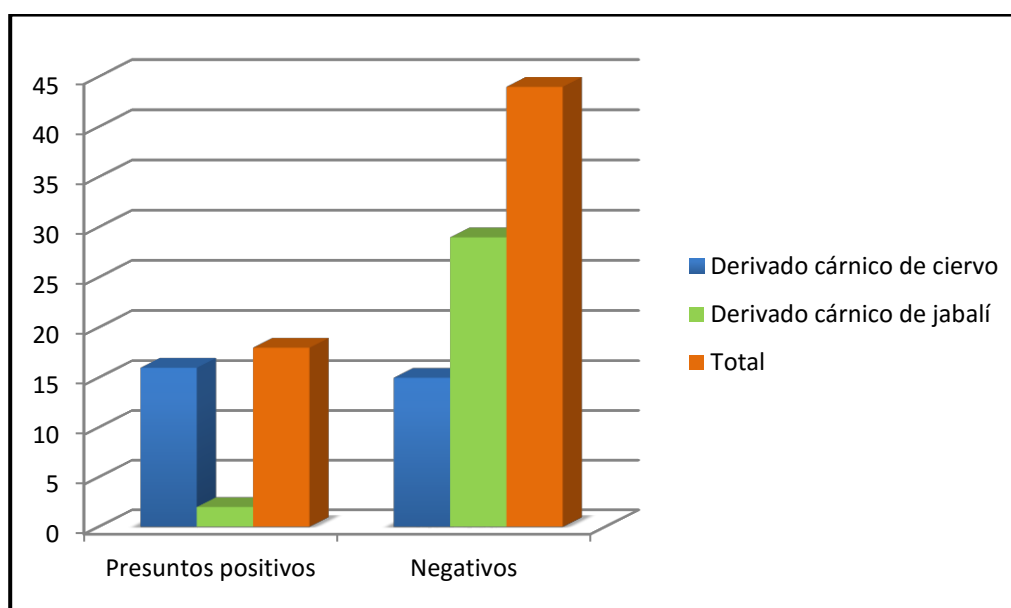


Figura 16 Resultado del cribado de STEC según el tipo de derivado cárnico

Los genes que codifican los factores de virulencia aislados en las muestras analizadas se representan en la Figura 17 de la página siguiente. Se han obtenido un total de 38 muestras positivas al gen *eae*, 17 muestras positivas al gen *Stx 1/2* y una al gen *O157*.

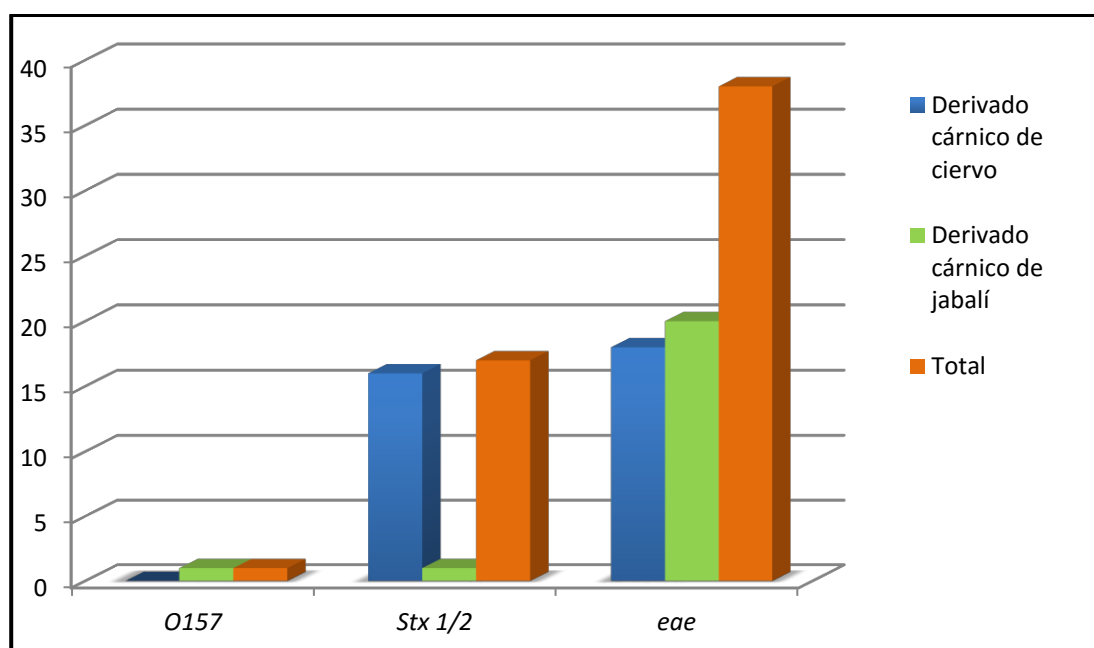


Figura 17 Genes que codifican factores de virulencia presentes en las muestras

Es preciso señalar que en el ADN de una misma muestra se pueden encontrar codificados uno, dos o los tres genes de la sonda de cribado de STEC. En la Tabla 27 se resumen las combinaciones de genes que hemos encontrado entre las muestras presuntas positivas.

Tabla 27 Combinaciones de genes que codifican factores de virulencia obtenidos entre las muestras presuntas positivas

Combinación de genes	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí
<i>O157 + eae</i>	0	1
<i>Stx 1/2 + eae</i>	14	0
<i>Stx 1/2</i>	2	1

9.2. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO NUTRICIONAL.

Se ha realizado el estudio nutricional a las 90 muestras, 59 correspondientes a derivados cárnicos de ciervo y 31 derivados cárnicos de jabalí. Los valores medios del contenido de proteínas, humedad, grasa y cenizas se recogen en la Tabla 28. Los derivados cárnicos de ciervo son más magros, tienen más contenido en agua y son menos grasos que los derivados cárnicos de jabalí.

Tabla 28 Valores medios de macronutrientes en derivados de carne de caza (% m – m)

Macronutriente	Derivados de carne de caza	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí
Proteínas	21,1 (1,0)	21,2 (0,8)	20,8 (1,3)
Humedad	75,3 (2,1)	76,5 (1,2)	73,1 (1,5)
Grasa	0,6 (0, 8)	0,3 (0,2)	1,2 (1,2)
Cenizas	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)

Entre paréntesis: desviación estándar.

Estos valores se representan en la

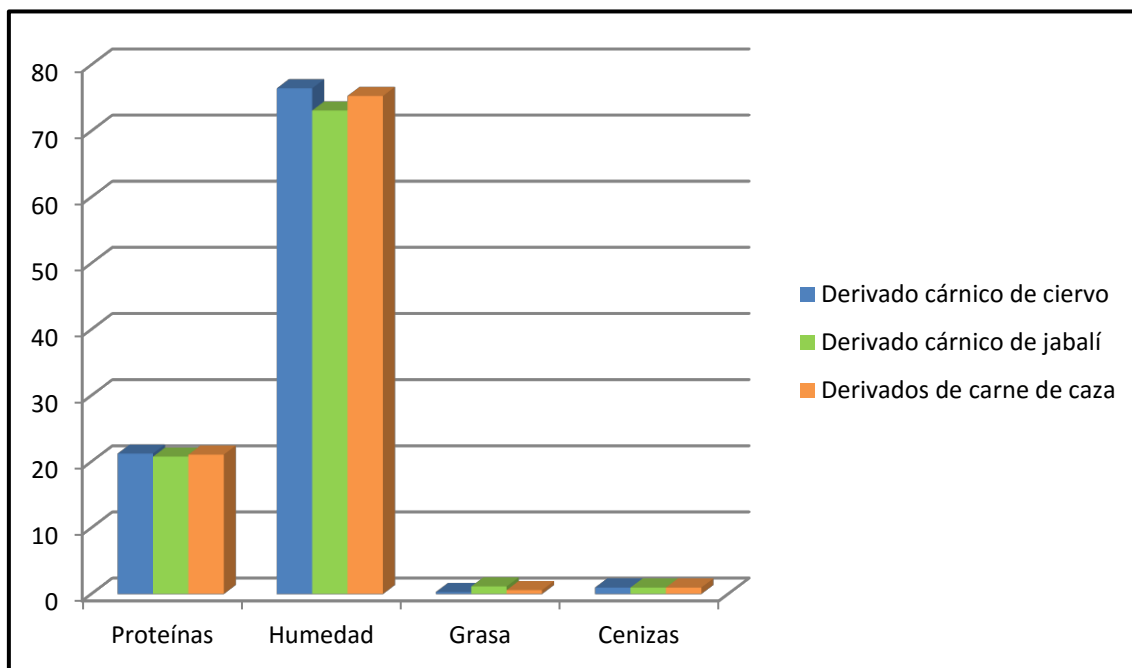


Figura 18.

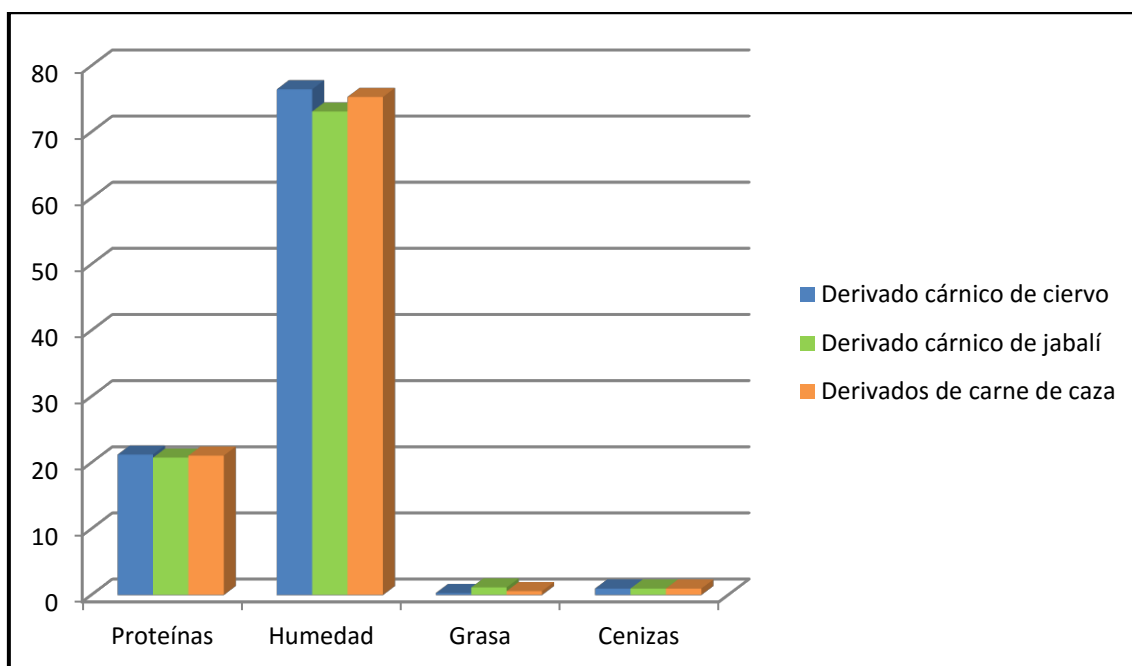


Figura 18 Valores medios de macronutrientes en derivados de carne de caza (% m - m)

9.2.1. CONTENIDO PROTEICO.

Tras analizar la distribución de los resultados de los diferentes macronutrientes según la especie del derivado de carne de caza, podemos observar en la Figura 19 que la mediana de contenido proteico en los derivados de carne de ciervo es 21,0 (RI 1,2) % y en los derivados de carne de jabalí de 20,6 (RI 1,3) %.

Vemos que los resultados son más homogéneos en los derivados cárnicos de jabalí, aunque su mediana es menor. Sólo aparece un valor atípico por encima del 24 % y es en este tipo de derivados.

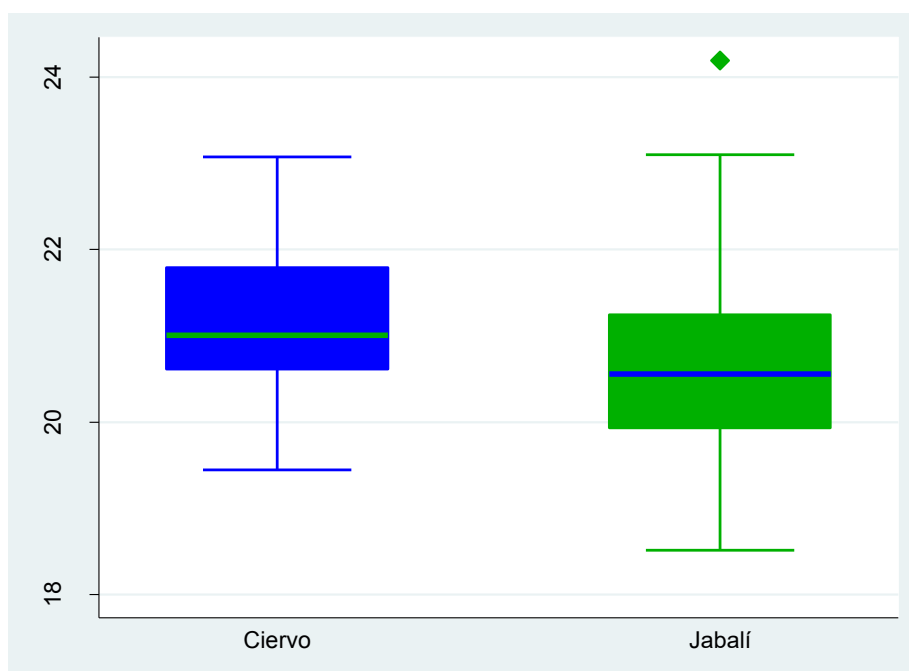


Figura 19 Distribución del contenido proteico según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m)

9.2.2. CONTENIDO EN GRASA BRUTA INTRAMUSCULAR.

La distribución de la grasa bruta intramuscular se representa en la Figura 20. La mediana de los derivados cárnicos de jabalí, 0,9 (RI 1,1) % es mayor incluso que el rango intercuartílico de los derivados cárnicos de ciervo 0,2 (RI 0,3) %.

Los resultados más homogéneos corresponden a los derivados cárnicos de ciervo. La mediana es menor a la de los derivados cárnicos de jabalí.

Tenemos valores atípicos en ambas especies cinegéticas llegando a casi al 5 % en el caso de los derivados cárnicos de jabalí y sobrepasando el 1 % en los de ciervo.

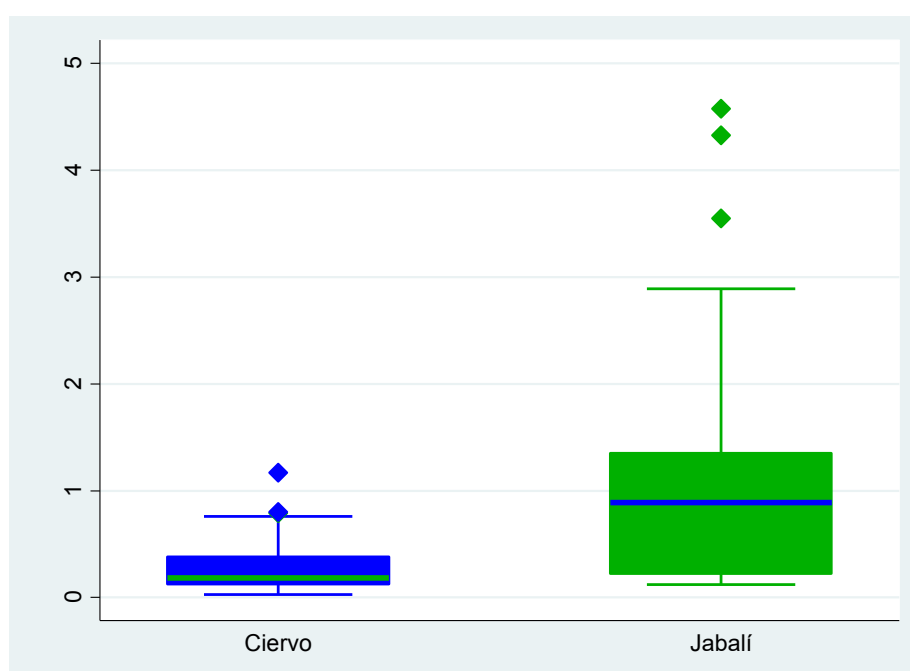


Figura 20 Distribución de la grasa total intramuscular según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m)

9.2.3. CONTENIDO EN AGUA.

La mediana de los resultados del contenido en agua de los derivados cárnicos de ciervo también presenta mayor valor que los de jabalí, concretamente un 76,5 (RI 1,7) % frente a un 72,8 (RI 2,3) % (Figura 21).

Los resultados menos dispersos son los correspondientes a los derivados cárnicos de ciervo. Además, estos presentan una mayor mediana. Incluso su bigote inferior se encuentra prácticamente a la altura del tercer cuartil de los resultados correspondientes a los derivados cárnicos de jabalí.

No hemos obtenido ningún resultado atípico.

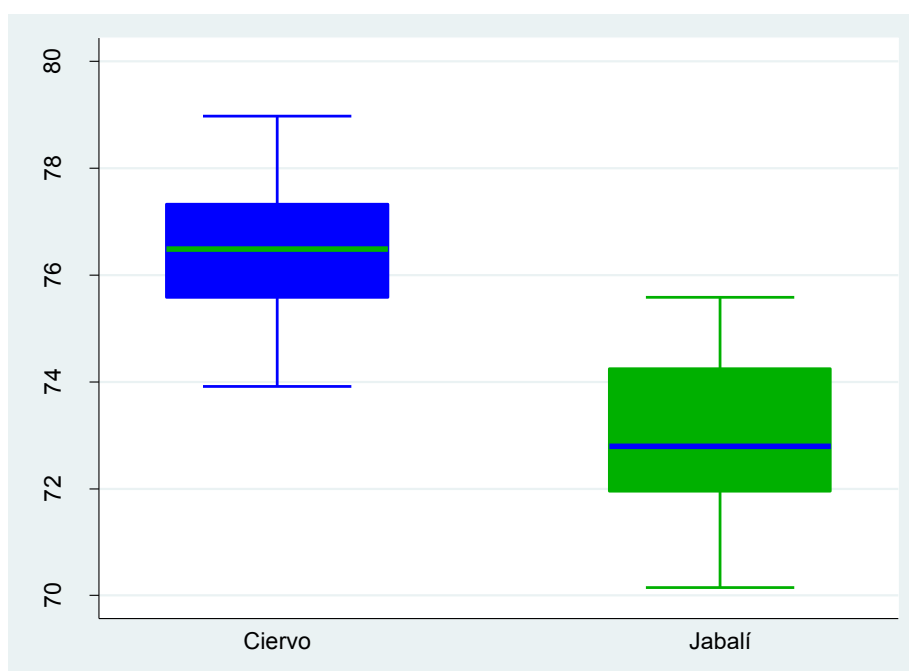


Figura 21 Distribución del contenido en agua según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m)

9.2.4. CONTENIDO EN CENIZAS.

La distribución del contenido de cenizas se representa en la Figura 22, donde podemos ver que la mediana en ambos derivados cárnicos es prácticamente igual; 0,96 (0,1) % en el jabalí frente a 0,98 (0,1) % en el ciervo.

Los resultados son más homogéneos en los derivados cárnicos de jabalí que en los de ciervo.

Sólo hemos obtenido un resultado atípico en los derivados cárnicos de ciervo, alcanzando casi el 1,3 %.

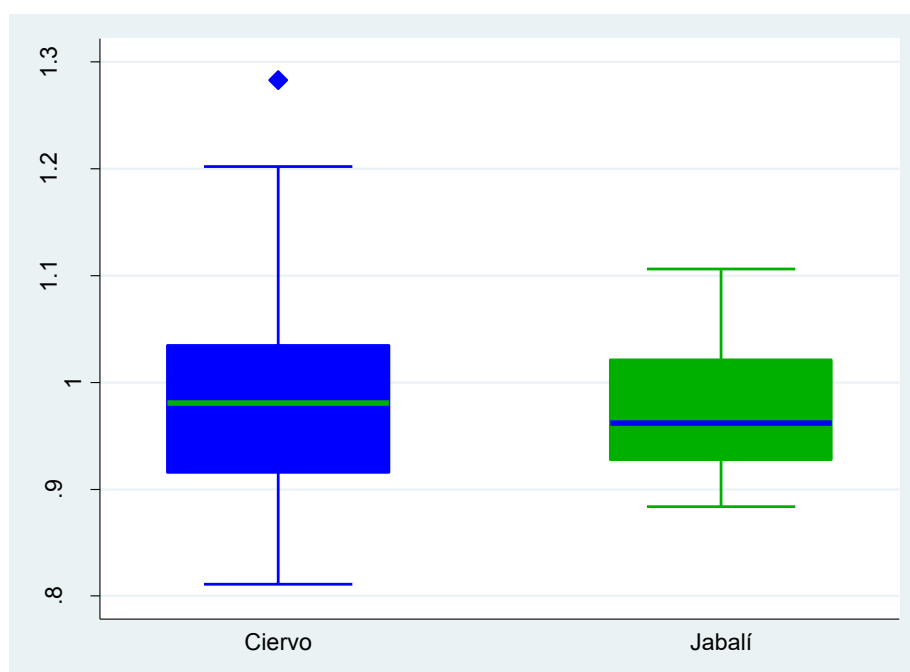


Figura 22 Distribución del contenido en cenizas según la especie cinegética del derivado cárnico (% m – m)

9.2.5. CONTENIDO CALÓRICO.

El contenido calórico medio de los derivados cárnicos de ciervo y jabalí se resumen en la Tabla 29.

**Tabla 29 Contenido calórico medio según el tipo de derivado
cárnico (kJ ó Kcal/100 g.)**

Tipo de derivado cárnico	Kilojulios	Kilocalorías
Derivado cárnico de jabalí	391,3	93,5
Derivado cárnico de ciervo	366,6	87,6

9.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

En primer lugar, hemos realizado el test de Shapiro-Wilk para comprobar si las variables cuantitativas siguen una distribución normal. Los resultados se recogen en la Tabla 30.

Tabla 30 Resultado del test de distribución normal de Shapiro-Wilk

Variable	Observaciones	Estadístico W	ρ valor
Proteína	90	0,98543	0,41541
Grasa	90	0,59887	<0,00001
Humedad	90	0,96048	0,00786
Cenizas	90	0,95430	0,00311
Aerobios mesófilos totales	62	0,95229	0,01723
Enterobacterias	62	0,96881	0,11574
Coliformes totales	62	0,96990	0,13140
<i>E. coli</i> glucoronidasa positivos	62	0,95649	0,02769
Estafilococos coagulasa positivos	46	0,89313	0,00051

Únicamente las variables Proteína, Enterobacterias y Coliformes totales siguen una distribución normal. Para evaluar si la diferencia de medias según la especie del derivado cárnico es estadísticamente significativa utilizaremos el test estadístico T de Student. En el resto de variables utilizaremos el test no paramétrico U de Mann-Whitney o suma de rangos de Wilcoxon.

9.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

Los resultados tras realizar el test estadístico t de Student para evaluar la diferencia de las medias expresadas en LOG ufc/g de enterobacterias y coliformes totales se resumen en la Tabla 31.

Tabla 31 Prueba t de Student para evaluar la diferencia en el recuento medio de enterobacterias y coliformes totales según el tipo de derivado cárnico (LOG ufc/g)

Indicador	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí	Estadístico t	ρ valor
Enterobacterias	5,1 (0,5)	4,6 (0,7)	3,2038	0,0022
Coliformes totales	4,9 (0,4)	4,4 (0,6)	3,7454	0,0004

Entre paréntesis: desviación estándar.

Los derivados cárnicos de jabalí analizados presentan menor concentración de enterobacterias y coliformes totales, siendo esa diferencia estadísticamente significativa, ya que el ρ valor es menor a 0,05.

Los resultados tras realizar el test no paramétrico U de Mann-Whitney para evaluar la diferencia de las medias expresadas en LOG ufc/g de aerobios mesófilos totales, *E. coli* glucuronidasa positivos y estafilococos coagulasa positivos se resumen en la Tabla 32.

Tabla 32 Prueba U de Mann-Whitney para evaluar la diferencia del recuento medio de aerobios mesófilos totales, *E. coli* glucuronidasa positivo y estafilococos coagulasa positivos según el tipo de derivado cárnico (LOG ufc/g)

Indicador	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí	Estadístico Z	ρ valor
Aerobios mesófilos totales	7,2 (0,9)	7,06 (0,5)	- 0,099	0,9214
<i>E. coli</i> glucuronidasa positivos	4,7 (0,4)	4,2 (0,6)	3,732	0,0002
Estafilococos coagulasa positivos	2,2 (1,0)	1,6 (0,9)	2,225	0,0261

Entre paréntesis: desviación estándar.

Como podemos observar, las muestras de derivados cárnicos de jabalí presentan menos contaminación de los tres indicadores, pero esa diferencia sólo es estadísticamente significativa en el caso de *E. coli* glucoronidasa positivos y los estafilococos coagulasa positivos ya que el p valor obtenido es menor que 0,05.

9.3.2. ASOCIACIÓN ENTRE EL TIPO DE DERIVADO CÁRNICO Y LA PRESENCIA DE *SALMONELLA* SPP.

El resultado obtenido tras realizar el test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar la asociación entre el tipo de derivado cárnico y la presencia de *Salmonella* spp. se recoge en la Tabla 33.

Tabla 33 Test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar la asociación entre el tipo de derivado cárnico y la presencia de *Salmonella* spp.

Tipo de derivado cárnico	Presencia	Ausencia	Estadístico Ji-cuadrado	p valor
Derivado cárnico de ciervo	32,3 %	67,7 %	8,9519	0,003
Derivado cárnico de jabalí	3,2 %	96,8 %		

La prevalencia de *Salmonella* spp. es mayor en los derivados cárnicos de ciervo analizados y esa diferencia es estadísticamente significativa ya que el p valor obtenido es menor que 0,05.

9.3.3. ASOCIACIÓN ENTRE EL TIPO DE DERIVADO CÁRNICO Y LA PRESENCIA DE STEC.

El resultado obtenido tras realizar el test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar la asociación entre el tipo de derivado cárnico y la presencia de STEC presuntos positivos se recoge en la Tabla 34.

Tabla 34 Test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar la asociación entre la entre el tipo de derivado cárnico y los STEC presuntos positivos

Tipo de derivado cárnico	Presunto positivo	Negativo	Estadístico Ji-cuadrado	ρ valor
Derivado cárnico de ciervo	51,6 %	48,4 %	15,3434	< 0,001
Derivado cárnico de jabalí	6,5 %	93,6 %		

La prevalencia de presuntos positivos de STEC es mucho mayor en los derivados cárnicos de ciervo. Esta diferencia es estadísticamente significativa ya que el ρ valor obtenido es menor que 0,05.

Asociación entre el tipo de derivado cárnico y los diferentes factores de virulencia

El resultado obtenido tras realizar el test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar la asociación entre el tipo de derivado cárnico y la prevalencia de los genes que codifican distintos factores de virulencia se recoge en las Tablas 35, 36 y 37.

Tabla 35 Test Ji-cuadrado para evaluar la asociación entre la presencia del gen O157 y el tipo de derivado cárnico

Tipo de derivado de cárnico	Presencia	Ausencia	Estadístico Ji-cuadrado	ρ valor
Derivado cárnico de ciervo	0 %	100 %	1,0164	0,313
Derivado cárnico de jabalí	3,2 %	96,8 %		

Tabla 36 Test Ji-cuadrado para evaluar la asociación entre la presencia del gen *Stx 1/2* y el tipo de derivado cárnico

Tipo de derivado de cárnico	Presencia	Ausencia	Estadístico Ji-cuadrado	p valor
Derivado cárnico de ciervo	51,6 %	48,4 %	18,2353	<0,001
Derivado cárnico de jabalí	3,2 %	96,8 %		

Tabla 37 Test Ji-cuadrado para evaluar la asociación entre la presencia del gen *eae* y el tipo de derivado cárnico

Tipo de derivado de cárnico	Presencia	Ausencia	Estadístico Ji-cuadrado	ρ valor
Derivado cárnico de ciervo	58,1 %	41,9 %	0,2719	0,602
Derivado cárnico de jabalí	64,5 %	35,5 %		

La prevalencia de los factores de virulencia codificados por los genes *eae* y O157 es mayor en los derivados cárnicos de jabalí pero esa diferencia no es estadísticamente significativa ya que el ρ valor obtenido en ambos casos es mayor que 0,05.

Por el contrario, la prevalencia del factor de virulencia codificado por el gen *Stx1/2* es mayor entre los derivados cárnicos de ciervo y en este caso, si que es estadísticamente significativa, ya que el ρ valor obtenido es menor que 0,05.

9.3.4. ASOCIACIÓN ENTRE EL TIPO DE DERIVADO CÁRNICO Y LOS DIFERENTES MACRONUTRIENTES.

Los resultados tras realizar el test estadístico t de Student para evaluar la diferencia del contenido proteico expresado en % (m-m) según el tipo de derivado de carne de caza se resumen en la Tabla 38.

Tabla 38 Prueba t de Student para evaluar el contenido proteico medio según el tipo de derivado cárnico (% m – m)

Macronutriente	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí	Estadístico t	ρ valor
Contenido proteico	21,2 (0,8)	20,8 (1,3)	2,0855	0,0399

Entre paréntesis: desviación estándar.

Como podemos observar, los derivados cárnicos de ciervo analizados contienen mayor cantidad de proteína y esa diferencia es estadísticamente significativa ya que el ρ valor obtenido es menor a 0,05.

Los resultados tras realizar el test no paramétrico U de Mann-Whitney para evaluar la diferencia del contenido en grasa, cenizas y humedad expresados en % (m – m) según el tipo de derivado de carne de caza se resumen en la Tabla 39.

Tabla 39 Prueba U de Mann-Whitney para evaluar el contenido medio de agua, grasa total intramuscular y cenizas según el tipo de derivado cárnico (% m – m)

Macronutriente	Derivado cárnico de ciervo	Derivado cárnico de jabalí	Estadístico Z	p valor
Humedad	76,5 (1,2)	73,1 (1,5)	7,205	<0,0001
Grasa total intramuscular.	0,3 (0,2)	1,2 (1,2)	- 4,666	<0,0001
Cenizas	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)	0,284	0,7761

Entre paréntesis: desviación estándar.

Los derivados cárnicos de ciervo presentan menor contenido en grasa intramuscular y mayor contenido en agua que los derivados cárnicos de jabalí. Esa diferencia es estadísticamente significativa ya que el ρ valor obtenido es menor que 0,05.

Sin embargo, vemos que no hay diferencias estadísticamente significativas en el contenido de cenizas, ya que el ρ valor obtenido es mayor que 0,05.

9.4. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

9.4.1. INDICADORES MICROBIOLÓGICOS.

Los límites microbiológicos que hemos utilizado para comprobar si nuestros resultados se consideran satisfactorios se encuentran resumidos en la Tabla 40.

Tabla 40 Límites microbiológicos de higiene de los procesos

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de muestreo		Límites	
		n	c	m	M
Canales de ovinos	Recuento de colonias aerobias			3,5 LOG ufc/cm ²	5,0 LOG ufc/cm ²
	Enterobacterias			1,5 LOG ufc/cm ²	2,5 LOG ufc/cm ²
Canales de porcinos	Recuento de colonias aerobias			4,0 LOG ufc/cm ²	5,0 LOG ufc/cm ²
	Enterobacterias			2,0 LOG ufc/cm ²	3,0 LOG ufc/cm ²
Preparados cárnicos	<i>E. coli</i>	5	2	2,7 LOG ufc/g	3,7 LOG ufc/g

Fuente: Reglamento 1441/2007

Elaboración propia.

9.4.2. INVESTIGACIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS.

En el punto 1.6 del capítulo I del ANEXO I del Reglamento 1441/2007 se establece que no se aislará *Salmonella* spp. para la “carne picada y preparados de carne a base de especies distintas a las aves de corral destinados a ser consumidos cocinados”.

9.5. ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES DE LAS ESPECIES DOMÉSTICAS DE ABASTO.

Los valores del análisis nutricional de macronutrientes de las especies domésticas de abasto que hemos tomado como referencia para realizar la comparación con el resultado obtenido para los derivados cárnicos de las especies cinegéticas de nuestro estudio se resumen en la Tabla 41.

Tabla 41 Valores de referencia en contenido de macronutrientes en carne de cerdo y de cordero (g/100g)

Pieza cárnica	Contenido proteico	Grasa total intramuscular	Humedad	Fuente
Carne magra de cerdo	20	8,3	71,7	Moreiras <i>et al.</i> (2015)
Pierna de cordero	17,9	18,7	63,4	
Pierna de cerdo	20,48	5,41	72,9	USDA Food Composition Databases
Paletilla de cordero	20,09	11,38	68,69	

10. DISCUSIÓN.

10.1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO.

10.1.1. TIPO DE MUESTRA.

El daño que sufren los microorganismos durante el proceso de congelación varía dependiendo de diversos factores tales como la fase del ciclo bacteriano (276) o el tipo de alimento que están colonizando. Por ejemplo, aquellos que presentan un alto contenido en proteínas, otorgan una buena protección a los microorganismos (277). Se ha elegido este tipo de muestra porque la carga microbiológica inicial experimenta cambios cuantitativos mínimos durante el almacenamiento.

10.1.2. INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

La *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) estableció en el año 2002 las características que debían presentar los microorganismos indicadores (278):

- La presencia del indicador debería implicar un fallo o contaminación durante el proceso de manipulación o producción de un alimento.
- La supervivencia del indicador debe ser similar o incluso mayor que la del peligro microbiológico.
- Las condiciones de crecimiento del indicador deben ser, al menos, tan rápidas como en el peligro microbiológico.
- Las características del indicador deben permanecer estables en el tiempo.
- Los métodos de detección o cuantificación deben ser rápidos, fiables, sensibles, validados y que no conlleven un riesgo para la salud del analista.
- En los métodos cuantitativos debe existir correlación entre la concentración del indicador y del peligro microbiológico.

Aerobios mesófilos totales.

Su uso como indicadores en carne y derivados cárnicos nos da una idea global del cumplimiento de unas Buenas Prácticas de Higiene a lo largo del proceso de producción (279).

Además, el Reglamento CE 1441/2007 (267), en el capítulo 2.1 del Anexo I, utiliza los aerobios mesófilos totales como criterio de higiene de los procesos para el control de las canales de carne de los animales domésticos de abasto, ya que no se han encontrado referencias legales a la carne y derivados cárnicos de caza.

El método oficial de recuento de aerobios mesófilos totales se describe en la norma ISO 4833 (280,281). Se ha utilizado un método alternativo de recuento basado en la técnica del número más probable (NMP), que ha sido validado por la *Association Française de Normalisation* AFNOR) (282). Además, Crowley *et al.* (283), compararon los recuentos logarítmicos medios, la repetibilidad y la reproducibilidad de esta técnica alternativa frente al método de elección de recuento de aerobios mesófilos totales de la *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC) para productos alimenticios excepto leche y derivados lácteos y los *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (SMEDP) para leche y derivados lácteos, obteniendo resultados estadísticamente comparables entre ambas técnicas.

Enterobacterias.

Las enterobacterias se utilizan sólo como indicadores de contaminación fecal en mataderos (279), ya que existen trabajos que cuestionaban su uso como indicadores de patógenos específicos (284), como por ejemplo *Salmonella* spp.

Sin embargo, el uso de las Enterobacteriáceas como indicador de calidad microbiológica está aumentando porque el uso exclusivo de coliformes y coliformes fecales puede proporcionar una falsa sensación de seguridad en el caso de que la contaminación mayoritaria provenga de microorganismos que no fermentan la lactosa, como los patógenos *Salmonella* spp., *Shigella* y algunas cepas enteroinvasivas de *E. coli* como O124 (143).

En esta línea se sitúa el trabajo de Ruby e Ingham, en el que utilizan las enterobacterias como indicador de *Salmonella* spp. con resultados satisfactorios (285).

Además, el Reglamento CE 1441/2007 (267), también especifica que se deben usar las enterobacterias como criterio de control de la higiene de los procesos.

El método de análisis oficial se describe en la norma ISO 21528-2 (286). En nuestro trabajo utilizamos un método alternativo de recuento basado en la técnica del NMP, el cual ha sido revalidado por AFNOR en el año 2014 (287). Owen *et al.* compararon esta técnica frente la descrita por la norma ISO 21528-2:2004 y los resultados que obtuvieron fueron totalmente satisfactorios (288).

Coliformes totales.

Las bacterias coliformes se pueden utilizar como indicadores de higiene microbiológica, especialmente en el procesado y manipulación de los alimentos de origen animal, entre los que se encuentran los derivados cárnicos. Incluso se pueden utilizar para evaluar algunos procesos tecnológicos de reducción de carga microbiológica mediante el uso de calor aplicados a los derivados cárnicos (289).

Existen multitud de medios de cultivo selectivos para el recuento de coliformes, o la técnica del NMP, más sensible que el recuento en placa pero menos precisa y mucho más laboriosa (290).

En nuestro trabajo hemos utilizado un método alternativo de recuento basado en la técnica del NMP. validado por AFNOR (291).

***E. coli* glucuronidasa positivos.**

El uso de *E. coli* como indicador de contaminación fecal está muy extendido, de hecho es el utilizado por la legislación europea (267,292,293). Los resultados de su uso como indicador de microorganismos patógenos son más inconsistentes (294).

Es importante señalar que las cepas detectadas mediante este método no incluyen *E. coli* O157:H7, puesto que en este último habitualmente, la enzima glucuronidasa carece de actividad (295). No obstante y aunque no es habitual, se han aislado cepas de *E. coli* O157:H7 glucuronidasa positivas en ciervos (296).

El método de análisis oficial que dicta la normativa europea viene descrito en la norma ISO 16649 (297,298). El que hemos utilizado nosotros es un método alternativo de recuento revalidado por AFNOR en 2012 (299). Además, Crowley *et al.* realizaron un estudio colaborativo en el que llegaron a la conclusión que era un método fiable para el recuento de *E. coli* glucuronidasa positivos en alimentos (300).

Estafilococos coagulasa positivos.

La capacidad de este microorganismo para sintetizar una enterotoxina, hace que una gran parte de los autores lo consideren un patógeno alimentario (226). De hecho, el Reglamento CE 1441/2007 (267) incluye, en el capítulo 1.21 del Anexo I, la detección de toxina estafilocócica como criterio de seguridad alimentaria. En el capítulo 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5 y 2.2.7 del mismo Anexo, se establecen los criterios de higiene de los procesos, y en este caso, son los estafilococos coagulasa positivos los que se buscan como indicadores de calidad microbiológica, por lo que también pueden interpretarse como un indicador de higiene personal y buenas prácticas de manipulación por parte de los trabajadores (227).

El método de análisis que exige la normativa europea es el descrito por la norma ISO 6888:1999 (301,302). Nosotros hemos utilizado un método

alternativo de recuento basado en la técnica del NMP, el cual ha sido validado por AFNOR como equivalente a la norma ISO 6888-2:1999 (303).

10.1.3. INVESTIGACIÓN Y RECuento DE PATóGENOS ALIMENTARIOS.

Salmonella spp.

El Reglamento CE 1441/2007 exige la ausencia de *Salmonella spp.* en las carnes picadas y preparados cárnicos de las especies distintas de las aves de corral (267).

El método oficial de análisis se describe en la norma ISO 6579:2002 (304). En nuestro caso, hemos utilizado un cribado previo basado en un análisis de fluorescencia ligado a enzima. (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay*). En diversos trabajos se ha comprobado su sensibilidad y especificidad, no llegando a detectar ningún falso negativo (305–307). En estos trabajos se han producido falsos positivos, por lo que se confirmó cada positivo de dos maneras diferentes:

La primera de ellas, siguiendo la norma ISO 6579:2002 a partir del enriquecimiento selectivo hasta la confirmación antigénica del positivo.

La segunda, utilizando técnicas de biología molecular. La PCR en tiempo real ha demostrado tener más sensibilidad que las técnicas inmuno-enzimáticas (308,309), por lo que su uso para la confirmación de positivos es muy recomendable.

Listeria monocytogenes.

La legislación europea especifica que la presencia de *Listeria monocytogenes* será como máximo de 10^2 ufc/g en alimentos listos para el consumo que puedan o no favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales. Aunque las muestras que hemos analizado no se encuentran incluidas en esta definición, hemos decidido investigar este patógeno alimentario por dos motivos:

Es la toxiinfección alimentaria con la tasa de mortalidad más alta (310).

Listeria monocytogenes es psicrótrofa, por lo que puede crecer normalmente a temperaturas de refrigeración (209).

El hecho de que la carne de caza y sus derivados puedan estar contaminados con *Listeria monocytogenes* puede implicar un riesgo durante su manipulación mediante contaminación cruzada. Además, esa contaminación no se controla mediante el almacenamiento de los diferentes alimentos a temperaturas de refrigeración.

El método oficial de análisis para recuento de *Listeria monocytogenes* viene recogido por la norma ISO 1129-2 (311). En nuestro caso, hemos utilizado éste método y el límite inferior que podíamos enumerar se ha establecido en 10^2 ufc/g, debido a la técnica de siembra que hemos utilizado.

Para eliminar la posibilidad de que alguna muestra pudiese presentar una contaminación de $< 10^2$ ufc/g, hemos completado el estudio de éste patógeno mediante realización de una técnica cualitativa mediante PCR en tiempo real. El pre-enriquecimiento de la muestra junto con una mayor sensibilidad de las técnicas moleculares, nos permite detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* aun cuando no sea posible aislarla en un medio de cultivo (312).

***Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC).**

La presencia de STEC en carnes y derivados cárnicos, ya sean de origen cinegético o no, no está regulada en la Unión Europea. El hecho de que la toxiinfección más importante en Europa por transmisión de STEC haya sido provocada por alimentos de origen vegetal (313), ha influido notablemente en la promulgación del Reglamento de Ejecución UE 208/2013 (314).

El papel de las especies cinegéticas en la transmisión de STEC se refleja en diferentes estudios (190,315,316). Por ello, hemos decido realizar una técnica de cribado mediante PCR en tiempo real para calcular la prevalencia de este patógeno alimentario.

El método que hemos utilizado está descrito en la norma ISO 13136:2012 (317). La elevada sensibilidad que proporcionan las técnicas moleculares nos ha sido de enorme utilidad (318) y en concreto la de esta sonda *multiplex* de Applied

Biosystems™, utilizada con éxito en el trabajo de Hara-Kudo *et al.* (319), alcanzando una sensibilidad del 100 % en carne picada de ternera con una carga inoculada de 4 – 6 ufc/25 g. Debido a la falta de recursos económicos, no se pudo realizar la segunda parte del método de análisis, lo que hubiera aportado una información muy útil para identificar los serotipos implicados en la transmisión de STEC mediante derivados de carne de caza.

10.1.4. ANÁLISIS NUTRICIONAL.

Preparación de muestras.

En el proceso de homogenización de las muestras, se trataron de eliminar las fascias musculares para evitar una sobreestimación del contenido proteico, dado que contienen más nitrógeno que el resto de proteínas musculares (320).

Contenido proteico.

La determinación del contenido proteico de una muestra se puede analizar mediante diferentes métodos (321–323). Nosotros hemos utilizado el método basado en la digestión con ácido sulfúrico y catalizador de cobre-selenio, conocido como método Kjeldahl. El factor de conversión que hemos utilizado para carne y derivados cárnicos es de 6,25 (324). Este factor puede tomar otros valores, como por ejemplo 6,38 en el caso de la leche y los derivados lácteos (323). Se ha utilizado este método por su sencillez y porque la AOAC lo reconoce como método de referencia (325).

Contenido en grasa bruta intramuscular.

De todas las técnicas disponibles para el análisis cuantitativo de grasa intramuscular (326–328), se ha escogido la determinación gravimétrica mediante método Soxhlet con digestión ácida previa. Tras una comparación entre varios métodos de extracción de grasas en productos cárnicos, es el que mejor resultados obtuvo cuando la concentración grasa esperada era muy baja (329), circunstancia con la que nos encontramos en la carne de caza.

Contenido en humedad.

El método más habitual para determinar el contenido en humedad de los alimentos es la pérdida de peso por desecación en hornos o estufas, aunque hoy en día existen diversos métodos para determinar el contenido en humedad de los alimentos (330,331). A pesar de que se están desarrollando nuevas técnicas donde se sustituye la fuente de calor tradicional por microondas o infrarrojos (332), nosotros hemos utilizado el método tradicional de determinación de

humedad mediante gravimetría con incubación en estufa a 100 °C durante 22 horas.

Contenido en cenizas.

Los diferentes métodos para determinar el contenido en cenizas de una muestra se basan en la obtención de un residuo blanco o gris claro tras someter a la muestra a temperaturas superiores a los 525 °C en una mufla, y medirlo hasta que la masa de dicho residuo permanezca constante (333).

Contenido calórico.

Desde que Atwater publicase la conversión calórica de cada macronutriente, no se han producido modificaciones sustanciales en esos valores (334) y su uso continúa vigente hasta la fecha (335). Aunque hay estudios que cuestionan esta afirmación, son trabajos cuya población de estudio no es representativa de la población en general (336,337). Por este motivo, nosotros hemos utilizado estos factores para calcular el contenido calórico de nuestras muestras.

10.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

10.2.1. INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

En este apartado se van a discutir los resultados obtenidos tras el recuento de los distintos microorganismos indicadores de calidad microbiológica. Es importante señalar que muchos de los trabajos utilizados como referencia para comparar nuestros resultados, corresponden a estudios de investigación de la contaminación microbiológica en canales de animales cinegéticos. El método de toma de muestras de dichas canales, destructivo o no-destructivo, influye notablemente en el recuento final de microorganismos, correspondiendo las cifras más altas con la modalidad de muestreo destructiva. Esto se recoge en el trabajo de Snijders *et al.* (338), en el trabajo de Hutchison *et al.* (339) y en la norma ISO 17604 (340), por lo que creemos que esta es la causa fundamental de que nuestros recuentos sean sistemáticamente más altos que en los estudios cuyas muestras se componen de canales de animales de interés cinegético exclusivamente.

Aerobios mesófilos totales.

Todos los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de cuantificación del equipo (2 – 9,7 LOG ufc/g).

El recuento medio de aerobios mesófilos totales es mayor en los derivados cárnicos de ciervo que en los de jabalí. Aunque la mediana ha sido menor en los derivados de ciervo, el rango intercuartílico ha sido muy superior; 0,7 frente a 1,5 LOG ufc/g. Según Paulsen y Winkelmayer (210), ésta diferencia, aunque no es estadísticamente significativa, puede deberse al mayor tamaño de las canales de ciervo y las dificultades que ocasiona en la evisceración. Esto podría ser una posible causa; otra podría ser las diferencias en el faenado en los establecimientos de manipulación de caza. En este sentido, Obwegeser *et al.* (341), encontraron diferencias de hasta dos unidades logarítmicas en el recuento de aerobios mesófilos totales en canales de ciervo procesadas en diferentes salas.

En el caso de los derivados cárnicos de jabalí, nuestros resultados concuerdan por lo publicado por Decastelli *et al.* (219) y Türk (342), si bien en el caso de éste último el recuento medio es ligeramente inferior con un rango de valores mucho más amplio que en nuestro caso; 2,6 – 8,6 frente a los 6,0 – 7,8 LOG ufc/g obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, nuestros resultados superan ampliamente los obtenidos por Avagnina *et al.* (343), Atanassova *et al.* (149), Paulsen *et al.* (236) y Paulsen y Winkelmayer (210).

Los resultados obtenidos en los preparados cárnicos de ciervo concuerdan con lo publicado con Gill (224). Al igual sucede en los preparados cárnicos de jabalí, donde nuestros valores superan los resultados obtenidos por Avagnina *et al.* (343), Atanassova *et al.* (149), Obwegeser *et al.* (341), Paulsen y Winkelmayer (210) y Türk (342).

Esta disparidad de resultados no se puede justificar con certeza ya que se desconocen aspectos importantes del proceso de producción del producto. Por ejemplo, el tiempo transcurrido desde que el animal es abatido hasta que se almacena la canal ya eviscerada o el mismo proceso de producción de los preparados cárnicos pueden ser la causa de estos recuentos tan elevados. El alto grado de manipulación al que son sometidos durante su elaboración hace que aumente el riesgo de contaminación de las mismas (344,345).

El músculo del animal, siempre que no se trate de la zona de impacto del proyectil, está prácticamente estéril. Por este motivo, es muy importante que las canales de las especies cinegéticas se almacenen a temperaturas de refrigeración cercanas a 0 °C para evitar una proliferación de aerobios mesófilos (346).

En el estudio de Atanassova *et al.* (149), la evisceración de los animales y la toma de muestras se realizó en un brevísimo lapso de tiempo, aproximadamente dos horas desde el abatido de la pieza. Todo ello, junto con el modo de toma de muestras, originaron un recuento de aerobios mesófilos totales muy bajo (2,9 y 3,2 LOG ufc/cm² en canales de ciervo y jabalí respectivamente).

Enterobacterias.

Todos los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de recuento del equipo (1 – 8,7 LOG ufc/g). Además, no se ha obtenido en ninguna muestra ningún recuento de enterobacterias superior al de aerobios mesófilos totales, por lo que todos los resultados son coherentes.

Los preparados cárnicos de jabalí presentan menor media y mediana en el recuento de este indicador que los preparados cárnicos de ciervo. Sin embargo, los resultados son más dispares, ya que el rango oscila de 3,5 – 6,2 LOG ufc/g frente a 4,4 – 6,2 en el caso de los ciervos.

El menor recuento medio obtenido en derivados cárnicos de jabalí no se ve respaldado por los resultados publicados por Avagnina *et al.* (343). En este trabajo el recuento medio de las canales de jabalí fue significativamente superior al de las canales de ciervo. Los resultados de Atanassova *et al.* (149) son similares a los obtenidos por Avagnina *et al.*, si bien no fueron estadísticamente significativos.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Wacheck (347) en derivados de carne de caza congelados, si bien obtuvo una media algo mayor que en nuestro caso 6,0 frente a 4,8 LOG ufc/g.

Si comparamos únicamente los derivados cárnicos de jabalí, nuestros resultados son similares a los publicados por Avagnina *et al.* en su trabajo realizado en canales de jabalí (343).

En cambio, como era de esperar, nuestros resultados superan lo publicado por Mirceta *et al.* (348), Obwegeser *et al.* (341), Atanassova *et al.* (149) y Paulsen y Winkelmayer (210) en canales de ciervo y jabalí. Incluso superamos en una unidad logarítmica el recuento de las canales con suciedad o contaminación fecal visible analizadas en el trabajo de Paulsen y Winkelmayer (210).

La causa del recuento tan elevado puede ser similar a la aportada en el caso de los aerobios mesófilos totales. Los preparados cárnicos pueden estar formados por partes de diferentes animales, lo que puede afectar a la carga microbiológica. Por ejemplo, aunque el recuento medio de enterobacterias del

trabajo de Mirceta *et al.* (348) fue inferior al nuestro, obtuvo un recuento medio superior el tercer día del estudio, lo que refleja la heterogeneidad en la contaminación microbiológica de las canales.

Otra posible causa puede ser el tiempo de almacenamiento de la canal hasta que se faena, ya que Liepina *et al.* (349) concluyeron que la tasa de crecimiento de las enterobacterias era mayor en ciervo que en corzo a temperaturas de 4 y 8 °C analizado diariamente y hasta una semana de almacenamiento.

Coliformes totales.

Todos los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de recuento del equipo (1 – 8,7 LOG ufc/g). No se ha producido ningún resultado incoherente ya que, en cada muestra, el recuento de coliformes totales ha sido inferior o igual al de enterobacterias. Se puede decir que prácticamente el 100 % de las enterobacterias correspondían con coliformes, ya que las medias son muy similares; 4,8 (0,6) y 4,7 (0,6) LOG ufc/g. No en vano, el coeficiente de correlación entre ambas variables es de 0,96.

No se han encontrado muchos trabajos donde se publiquen resultados de coliformes totales relacionados con carne o derivados de carne de caza. El recuento publicado por Bensink *et al.* (350) es ligeramente inferior al nuestro, lo que pudo deberse a que no aislaron coliformes de todas sus canales de jabalí; obtuvieron una prevalencia del 90,2 %. También utiliza esta especie cinegética el estudio de Naya *et al.* y el rango de su recuento de coliformes es inferior al nuestro (1 – 4,7 frente a 3,4 – 6,1 LOG ufc/g) (351).

No hemos encontrado ningún estudio que comparase la carga microbiológica de este indicador entre las especies de nuestro trabajo. Creemos que la diferencia del recuento entre los dos tipos de preparado cárnico es consecuencia directa del recuento de enterobacterias.

***E. coli* glucuronidasa positivos.**

Todos los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de recuento del equipo (1 – 8,7 LOG ufc/g). No se ha producido ningún resultado incoherente ya que, el recuento de *E. coli* glucuronidasa positivos ha sido inferior o igual al

de coliformes totales en cada muestra. En este caso, el coeficiente de correlación entre estos dos indicadores ha sido de 0,93, lo que indica que la práctica totalidad de coliformes corresponden con E coli glucuronidasa positivo.

El recuento medio de este indicador es mayor en derivados cárnicos de ciervo y esto concuerda con los resultados obtenidos por Membré *et al.* (238) y Türk (342). Sin embargo, nuestro recuento medio supera ampliamente los valores alcanzados por este trabajo. En este sentido, Wacheck también obtuvo un recuento medio inferior al nuestro (347).

Estafilococos coagulasa positivos.

El 74,1 % de los resultados fueron válidos. El resto se consideran no-válidos por no haber alcanzado el límite inferior de recuento del equipo, 1 LOG ufc/g. Ningún resultado ha excedido el límite superior de recuento.

Tanto la prevalencia como el recuento medio han sido superiores en los derivados cárnicos de ciervo, algo que concuerda en parte con lo publicado por Atanassova *et al.* (149). En este trabajo el recuento medio fue mayor en el caso de las canales de ciervo, aunque la prevalencia fue menor y ambas muy inferiores a las nuestras, 4,5 % frente a 87,1 % en ciervo y 6,3 % frente a 61,3% en jabalí.

El trabajo de Membré *et al.* (238) también difiere de nuestros resultados. El recuento medio de estafilococos coagulasa positivos de los derivados cárnicos de ciervo es menor que el de los derivados cárnicos de jabalí. No obstante, en ese trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas del recuento medio según la especie del derivado de carne de caza.

En línea con nuestros resultados, se encuentra el trabajo de Wacheck (347), cuyo recuento medio es 0,3 LOG ufc/g mayor que el nuestro.

Teniendo en cuenta únicamente los derivados cárnicos de jabalí, nuestros resultados se ven superados tanto por la prevalencia como los recuentos del trabajo de Decastelli *et al.* (219).

10.2.2. PATÓGENOS ALIMENTARIOS.

***Salmonella* spp.**

Todos los resultados obtenidos mediante técnicas inmunoenzimáticas posteriormente confirmadas mediante microbiología clásica coinciden con los obtenidos mediante técnicas moleculares.

La prevalencia en derivados cárnicos de ciervo ha sido 10 veces mayor que en los derivados cárnicos de jabalí. No hemos encontrado ningún estudio que respalde nuestros resultados. De hecho, el trabajo de Paulsen *et al.* (352) sugiere lo contrario. Incluso existe la hipótesis de que la presencia de vesícula biliar de algunas especies cinegéticas como por ejemplo el jabalí, las hace más sensibles a *Salmonella* spp. que en los ciervos (353).

Si analizamos cada tipo de derivado cárnico por separado, encontramos que Decastelli *et al.* (219), Díaz-Sánchez *et al.* (354) y Rodas *et al.* (355) obtuvieron una prevalencia similar en muestras de canales de jabalí.

En cuanto a los derivados cárnicos de ciervo, no hemos encontrado ningún trabajo cuya prevalencia fuese similar a la nuestra.

En cambio, el resultado más habitual de los trabajos relacionados con carne de caza, es la ausencia de *Salmonella* spp. (351,210,356,149,343).

El hecho de que las especies cinegéticas compartan las zonas de pastos con el ganado doméstico en explotaciones extensivas unido a la posibilidad de que los jabalíes sean portadores asintomáticos de *Salmonella* spp. (357), ha hecho que algunos autores utilicen muestras de heces para la investigación del estado de este patógeno alimentario entre la fauna salvaje (358). Las prevalencias encontradas oscilan entre el 22,1 % en heces de jabalí del trabajo de Vieira-Pinto *et al.* (154) hasta el 0 % del trabajo de Lillehaug *et al.* (150). En el caso del ciervo, las prevalencias son mucho menores y oscilan desde el 0% del trabajo de Obwegeser *et al.* (341) hasta el 1,8 % del trabajo de Magnino *et al.* (359).

Listeria monocytogenes.

La utilización de dos técnicas diferentes, recuento en placa e investigación mediante *Real Time* PCR, nos permite afirmar que no había *Listeria monocytogenes* en ninguna de nuestras muestras.

Estos datos concuerdan con lo publicado por Paulsen y Winkelmayer (210) que no encontraron *Listeria monocytogenes* entre sus muestras.

En la línea de este estudio, Membré *et al.* (238), encontraron concentraciones medias de 2 a 3 ufc/g en carne de ciervo y jabalí. No proporcionan datos de prevalencia, ya que procesaron todos los datos, incluso aquellos menores a 1 ufc/g (era su límite inferior de detección).

Los trabajos de Avagnina *et al.* (343) y Atanassova *et al.* (149) en canales de ciervo y jabalí, obtuvieron resultados positivos frente a *Listeria monocytogenes*, aunque con unas prevalencias situadas entre el 2,5 y el 5,0 %.

Tras analizar heces de ciervo y jabalí, los trabajos de Sasaki *et al.* (360) y Obwegeser *et al.* (341), tampoco obtuvieron ningún resultado positivo.

En otra línea de investigación, Weindl *et al.* (361) utilizaron contenido gástrico y del ciego, ganglios mesentéricos y heces para demostrar que, aunque no se excretase *Listeria monocytogenes* a través de las heces, el animal podía ser portador. La prevalencia que obtuvieron fue del 42,0 % en ciervo y de 24,5 % en jabalí.

***Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC).**

La prevalencia obtenida de STEC en los derivados cárnicos de ciervo es nueve veces superior a la de jabalí. El trabajo de Díaz-Sánchez *et al.* (354) corrobora estos resultados, aunque la prevalencia obtenida en canales de ciervo es menor a la nuestra 25,0 frente a 51,6 %. Sucede lo contrario en el caso de las canales de jabalí; su prevalencia es mayor que la nuestra; 18,0 frente a 6,5 %.

Rodas *et al.* (355) obtuvieron una prevalencia de STEC similar a la nuestra en carne de jabalí. En cambio, Díaz-Sánchez *et al.* (197) hallaron una prevalencia de un 25,4 %.

En cuanto a los derivados cárnicos de ciervo, la prevalencia obtenida por Wacheck (347), un 62,0 %, ha sido mayor que la nuestra. También Piérard *et al.* (362) en su trabajo sobre carne y canales de ciervo halló una prevalencia similar a la nuestra.

Tan sólo hemos encontrado una muestra positiva al gen *O157* entre los derivados cárnicos de jabalí, lo que concuerda con lo publicado por Navarro-González *et al.* (363).

En el trabajo de Miko *et al.* (195) sobre STEC en carne de caza, la presencia combinada de los genes *eae* y *Stx 2* fue hallada en el 32,8 % de las muestras, lo que supera el 22,6 % hallado en nuestras muestras.

En cuanto a la presencia del factor de virulencia codificado por el gen *eae*, nuestros resultados superan ampliamente los obtenidos por Beutin *et al.* (364) y Obwegeser *et al.* (341).

El papel de las especies cinegéticas, y en especial de los rumiantes salvajes, en la transmisión de STEC es cada vez más importante (316). Pueden actuar como fuente de la infección (45), o actuando como reservorio diseminando al agente patógeno en el medio ambiente y contaminando otros alimentos (365,366).

El hecho de que la fauna silvestre pueda actuar como reservorio de STEC, ha llevado a varios autores a investigar la prevalencia en muestras de heces. Los

resultados son dispares, debido fundamentalmente, al serotipo de *E. coli* investigado.

En aquellos trabajos en los que únicamente se centran en la búsqueda de *E. coli* O157:H7, las prevalencias halladas son muy bajas, casi nulas (151,354,367).

En cambio, la prevalencia en aquellos estudios cuyo objetivo es detectar todos los *E. coli* productores de toxinas Shiga es mucho mayor. Los valores obtenidos por algunos autores son los siguientes: Wachek *et al.* (368) en jabalíes obtuvo un 9,0 %, Obwegeser *et al.* (341) halló un 23,4 % en rumiantes salvajes, Díaz- Sánchez *et al.* (354) detectó un 35,0 % en ciervo y un 9,0 % en jabalí, y Sánchez *et al.* (190) y Lehmann *et al.* (369) hallaron un 50,0 % en trabajos llevados a cabo en rumiantes salvajes.

10.2.3. ANÁLISIS NUTRICIONAL.

El contenido en macronutrientes de la carne de caza puede variar dependiendo del sexo del animal, la edad, la época del año y el tipo de músculo utilizado para el análisis (370,371). Por ejemplo, en el trabajo de Stevenson (372) realizado sobre canales de hembras de ciervo, se detectó una pérdida de engrasamiento en las canales en un estudio comparativo de canales antes y después de pasar el celo. O en el trabajo de Ugarkovic y Uvarkovic (373), que encontró mayor contenido en grasa bruta intramuscular en los animales menores de 6 meses de su estudio.

Prácticamente todos los trabajos que hemos encontrado, han utilizado como muestra piezas cárnicas de *musculus longissimus* (lomo) o *musculus semimembranosus* (redondo). Al utilizar carne para estofado como muestras, los músculos que hemos utilizado mayoritariamente son los grupos flexores y extensores de las cuatro extremidades (morcillo), aunque pueden contener otras piezas cárnicas (374,375).

Contenido proteico.

Los derivados cárnicos de ciervo presentan un mayor contenido proteico medio que los de jabalí. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Zomborszky *et al.* (81) y Strazdina *et al.* (376), que afirman lo contrario. La dispersión de resultados es similar al trabajo de este último; los resultados de la carne de ciervo son más homogéneos que los de carne de jabalí.

El contenido proteico medio obtenido para la carne de ciervo es similar al publicado por Zomborszky *et al.* (81), aunque inferior a los obtenidos por Daszkiewicz *et al.* (64) y Nagy *et al.* (377). En cambio, el contenido proteico hallado por Drew y Hogg (378) en canales de hembras de ciervos fue menor que el nuestro.

En cuanto a los derivados cárnicos de jabalí, el contenido proteico medio es superior al publicado por Skobrák *et al.* en jabalíes criados en régimen semi-extensivo (379). Sin embargo, nuestro valor es inferior al obtenido por los

trabajos de Postolache *et al.* (83), Strazdina *et al.* (376) y Zomborszky *et al.* (81) en carne y canales de jabalí.

Contenido en grasa bruta intramuscular.

Los resultados de los derivados cárnicos de ciervo son más homogéneos que los de jabalí. De hecho, el rango de valores en los derivados cárnicos de jabalí oscila entre 0,1 y 4,6 %. Esta circunstancia se repite en los trabajos de Postolache *et al.* (83) y Daszkiewicz *et al.* (64).

Los valores de grasa bruta intramuscular que hemos obtenido en los derivados cárnicos de ciervo son similares a los publicados por Daszkiewicz *et al.* (64) en machos; los valores hallados en hembras triplican nuestros resultados. Los resultados de Quaresma *et al.* (91) y Polak *et al.* (380) se sitúan en torno al 1% de grasa bruta intramuscular, utilizando como muestras el músculo psoas mayor y el semitendinoso respectivamente. En esta línea, el contenido de grasa bruta intramuscular publicado por Strazdina *et al.* (381) es casi diez veces superior al nuestro.

El contenido medio de grasa bruta intramuscular de los derivados cárnicos de jabalí es el menor de cuantos trabajos hemos encontrado. Los resultados que más se aproximan a nuestros valores son los obtenidos por Postolache *et al.* (83), con un 2,6 % en *m. longissimus dorsi*, Zomborszky *et al.* (81), con un 3,5 % y Quaresma *et al.* (382), con un 4,5 %. Valores mucho mayores encontramos en el trabajo de Skobrák *et al.* (379), con un 14,1 % en jabalíes criados en explotación semi-extensiva.

Los derivados cárnicos de jabalí tienen un contenido medio de grasa bruta intramuscular mayor que los de ciervo. Esta diferencia concuerda con lo publicado por Zomborszky *et al.* (81), Strazdina *et al.* (381), Daszkiewicz *et al.* (64) y Postolache *et al.* (83).

Contenido en humedad.

El contenido medio en humedad obtenido en ambos derivados cárnicos está en consonancia con los datos publicados por Daszkiewicz *et al.* (64), Postolache *et al.* (83) y Zomborszky *et al.* (81). Estos valores se encuentran entre 75,2 y 76,9 % para la carne de ciervo y 72,8 y 74,7 % para la carne de jabalí.

En cambio, los resultados de Nagy *et al.* (377) son muy inferiores a los nuestros, 65,2 frente a un 76,5 %. Esto se explica debido al alto contenido en proteínas de dichas muestras, lo que aumenta el extracto seco de la muestra.

La diferencia significativa de contenido medio en humedad entre ambas especies cinegéticas se corresponde con lo publicado por Zomborszky *et al.* (81).

Contenido en cenizas.

El contenido medio en cenizas de ciervo es menor al obtenido por Daszkiewicz *et al.* (64) y Stradzina *et al.* (376). En este último trabajo también se analizó carne de jabalí y también superó nuestros valores.

En cambio, nuestros resultados están en consonancia con los valores hallados por Kay *et al.* (383) en ciervos criados en granjas y por Zomborszky *et al.* (81) en ambas especies cinegéticas.

No hemos encontrado ningún trabajo cuyas diferencias en contenido de cenizas entre carne de ciervo y jabalí sean estadísticamente significativas.

Contenido calórico.

El motivo por el cual los derivados cárnicos de jabalí aportan más energía que los de ciervo es el mayor contenido en grasa bruta intramuscular.

Únicamente hemos encontrado un trabajo que analizase el contenido calórico de la carne de caza (384). Las especies utilizadas para este estudio son oriundas de América del Norte, por lo que no aparecen en el estudio ni el ciervo ni el jabalí. De cuantos animales se incluyen en el trabajo, el más similar respecto del ciervo podría ser el ciervo mulo (*mule deer*) (*Odocoileus hemionus* Rafinesque, 1817). El contenido calórico del ciervo es mucho menor que el del ciervo mulo (366,6 frente a 498,2 kJ/100g) debido, fundamentalmente, a un contenido mayor de grasa, 2,7 frente a 0,3 %.

10.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS OBTENIDOS Y LOS LÍMITES ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

10.3.1. INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

Vemos que todas nuestras muestras superarían el límite superior de los dos indicadores microbiológicos de higiene de los procesos para las canales de ovinos y porcinos. Esto resulta lógico puesto que una canal está sometida a menos manipulación que la elaboración de preparados cárnicos.

Tan sólo 10 preparados cárnicos se encuentran dentro del límite establecido en el Reglamento 1441/2007 para *E. coli*. El resto de muestras son consideradas insatisfactorias por el Reglamento.

10.3.2. INVESTIGACIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS.

Únicamente 11 de las 62 muestras analizadas no cumplen con la legislación alimentaria vigente en materia de patógenos alimentarios.

10.4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES ENTRE LAS ESPECIES DOMÉSTICAS DE ABASTO Y CINEGÉTICAS.

El contenido medio proteico y de contenido en agua es mayor en las especies cinegéticas que en las especies domésticas de abasto con ambos valores de referencia. Por el contrario, el contenido en grasa total intramuscular es mayor en las especies domésticas de abasto.

10.5. LIMITACIONES.

La principal limitación con la que nos hemos encontrado ha sido la ausencia de financiación para la obtención de muestras. Ello ha reducido el tamaño muestral por lo que los resultados aquí obtenidos pudieran no ser todo lo representativos que hubiésemos deseado.

No hemos podido establecer si las diferencias existentes entre el análisis nutricional de macronutrientes de la carne de las especies domésticas de abasto y la carne de las especies cinegéticas ya que no hemos podido acceder a los datos primarios de los trabajos que hemos utilizado como referencia.

11. CONCLUSIONES.

PRIMERA	Los derivados cárnicos de jabalí presentan mayor calidad microbiológica que los derivados cárnicos de ciervo.
SEGUNDA	La calidad higiénica de los derivados cárnicos de jabalí es mayor que la de los derivados cárnicos de ciervo.
TERCERA	La carne de ciervo tiene un papel importante como reservorio de STEC no-O157.
CUARTA	El riesgo de transmisión de STEC O157 mediante la carne de caza es bajo.
QUINTA	La carne de caza se podría utilizar en dietas para el control del sobrepeso debido a su bajo contenido graso.
SEXTA	Los derivados cárnicos de jabalí aportan más energía metabolizable que los derivados cárnicos de ciervo.
SÉPTIMA	Se deberían establecer criterios microbiológicos propios para la carne y derivados cárnicos de especies cinegéticas.
OCTAVA	La carne de las especies cinegéticas es más magra y menos grasa que la de las especies domésticas de abasto.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. RAE. Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario [Internet]. Diccionario de la lengua española. 2014 [citado 28 de enero de 2016]. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=83ExEq7>
2. Robinson JT. Prehominid Dentition and Hominid Evolution. *Evolution*. 1954;8(4):324-34.
3. Blumenschine RJ, Cavallo JA. Carroñeo y evolución humana. *Investig Cienc*. 1992;195:70–77.
4. González J, Romanillo AM. Historia de la humanidad: El origen del hombre. Arlanza; 2000.
5. Rabinovich R, Gaudzinski-Windheuser S, Goren-Inbar N. Systematic butchering of fallow deer (*Dama*) at the early middle Pleistocene Acheulian site of Gesher Benot Ya 'aqov (Israel). *J Hum Evol*. 2008;54(1):134–149.
6. Roberts MB, Parfitt SA. Boxgrove: A Middle Pleistocene Hominid Site at Earham Quarry, Boxgrove, West Sussex [Internet]. English Heritage; 1999 [citado 28 de enero de 2016]. Disponible en: <http://discovery.ucl.ac.uk/31822/>
7. Milo RG. Evidence for hominid predation at Klasies River Mouth, South Africa, and its implications for the behaviour of early modern humans. *J Archaeol Sci*. 1998;25(2):99–133.
8. Rivals F. The Argali of the 'Caune de l'Arago'(southern France). Palaeoecology of a 440,000 years old population. En: Proceedings of the 3rd International Symposium on Mouflon [Internet]. 2000 [citado 28 de enero de 2016]. p. 27–29. Disponible en: [http://www.researchgate.net/profile/Florent_Rivals/publication/236856527_The_argali_of_the_Caune_de_l'Arago_\(Southern_France\).Palaeoecology_of_a_440_000_years_old_population/links/0c9605199fe2990c0e000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Florent_Rivals/publication/236856527_The_argali_of_the_Caune_de_l'Arago_(Southern_France).Palaeoecology_of_a_440_000_years_old_population/links/0c9605199fe2990c0e000000.pdf)
9. Moure JA, Santos J. Prehistoria y primeras civilizaciones: del Paleolítico a las colonizaciones mediterráneas. Madrid: Espasa Calpe S.A.; 1999. 160 p. (Historia de España.; vol. 1).
10. Fu Q, Rudan P, Pääbo S, Krause J. Complete Mitochondrial Genomes Reveal Neolithic Expansion into Europe. *PLoS ONE*. 13 de marzo de 2012;7(3):e32473.
11. de Trucios SJH. Evolución de la caza desde la Prehistoria hasta nuestros días. En: La caza como recurso económico y turístico [Internet]. Centro de Desarrollo Rural Campiña Sur; 2004 [citado 28 de enero de 2016]. p. 97-117. Disponible en:

- http://www.researchgate.net/profile/Sebastian_Hidalgo_de_Trucios/publication/268445884_Evolucin_de_la_caza_desde_la_prehistoria_hasta_nuestros_das/links/546b6a4e0cf2397f7831bf40.pdf
12. Pollit JJ. El arte helenístico [Internet]. Editorial Nerea; 1989 [citado 28 de enero de 2016]. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=50316>
 13. López Monteagudo G. La caza en el mosaico romano: Iconografía y simbolismo. 1991 [citado 29 de enero de 2016]; Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/16509>
 14. Castro MCF. La prehistoria de la Península Ibérica [Internet]. Crítica; 1997 [citado 29 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.geocities.ws/dchacobo/PrehistoriaPeninsula.PDF>
 15. Montoya MI. La caza en el medievo peninsular. Rev Electrónica Estud Filológicos [Internet]. 2003 [citado 29 de enero de 2016];6. Disponible en: <http://wwwclu.um.es/tonosdigital/znum6/portada/Cazamur.htm>
 16. Alfonso XI. Libro de la Montería. 1992;
 17. Caro López C. La caza en el siglo XVIII: sociedad de clase, mentalidad reglamentista. Hispania. 30 de diciembre de 2006;66(224):997-1018.
 18. Chapman A, Buck W-J. Unexplored Spain [Internet]. 1978 [citado 29 de enero de 2016]. Disponible en: <http://infodigital.opandalucia.es/bvial/handle/10326/823>
 19. Almazán D de. Historia de la montería en España. Inst Gráfico Oliva Vilanova Barc. 1934;
 20. de Figueroa Yebes CM. Veinte años de caza mayor. Espasa-Calpe; 1943.
 21. Hofer D, Blanco JC. The Lion's Share of the Hunt: Trophy Hunting and Conservation: a Review of the Legal Eurasian Tourist Hunting Market and Trophy Trade Under CITES: a TRAFFIC Europe Regional Report. Traffic Europe; 2002.
 22. Gallego JIR. La oferta de caza en España en el contexto del turismo cinegético internacional: las especies de caza mayor. Ería Rev Cuatrimest Geogr. 2009;(78):53-68.
 23. Danzberger JB. La caza: un elemento esencial en el desarrollo rural. Mediterráneo Económico. 2009;15:183–203.

24. Garrido J. La caza. Sector económico. Valoración por subsectores. Madrid: FEDENCA; 2012.
25. González López A. Procesos de patrimonialización en el mundo de la caza. Antropol Exp [Internet]. 2014 [citado 25 de julio de 2016];(13). Disponible en: <http://revista.ujaen.es/huesped/rae/articulos2013/16gonzalez13.pdf>
26. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. Anuarios de Estadística Forestal - Estadísticas - [Internet]. 2016 [citado 19 de febrero de 2016]. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/desarrollo-rural/estadisticas/forestal_anuarios_todos.aspx
27. Jefatura del Estado. Ley 1/1970, de 4 de abril, de Caza. [Internet]. BOE, 1/1970 abr 6, 1970 p. 5348-56. Disponible en: http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/l1-1970.html
28. Real Federación Española de Caza. Modalidades de caza [Internet]. 2014 [citado 7 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.fecaza.com/caza/modalidades.html#.V1bfBzWLRD8>
29. Hernández G. Torcaces.com » Equipo de un Cimbelerero » Los Cimbeles Vivos y Artificiales utilizados en la caza de torcaces. [Internet]. www.torcaces.com. 2014 [citado 20 de junio de 2016]. Disponible en: <http://torcaces.com/equipo-de-un-cimbelerero/los-cimbeles-vivos-y-artificiales-utilizados-en-la-caza-de-torcaces/>
30. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Real Decreto 1095/1989, de 8 de septiembre, por el que se declaran las especies objeto de caza y pesca y se establecen normas para su protección. 1095/1989 sep 13, 1989.
31. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Real Decreto 1118/1989, de 5 de septiembre, por el que se determinan las especies objeto de caza y de pesca comercializables y se dictan normas al respecto. BOE, 1118/1989 sep 16, 1989 p. 29453-4.
32. Mateos C, Alarcos S, Carranza J, Sánchez-Prieto CB, Valencia J. Fluctuating asymmetry of red deer antlers negatively relates to individual condition and proximity to prime age. Anim Behav. mayo de 2008;75(5):1629-40.
33. Malo JE, Suárez F. The dispersal of a dry-fruited shrub by red deer in a Mediterranean ecosystem. Ecography. 1 de abril de 1998;21(2):204-11.
34. Bützler W. *Cervus elaphus* Linnaeus, 1758—Rothirsch. Handb Säugetiere Eur. 1986;2(2):107–139.

35. Rodríguez Berrocal J. Introducción al estudio y valoración de recursos forestales y arbustivos para el ciervo, en el area ecológica de Sierra Morena. 1. Estudio de la dieta del ciervo. 1978 [citado 29 de enero de 2016]; Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/3025>
36. San José C, Braza F, Aragón S, Delibes JR. Habitat use by roe and red deer in Southern Spain. 1997 [citado 30 de enero de 2016]; Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/62784>
37. Carranza J, Salvador Milla A, others. Ciervo—*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758. 2011 [citado 29 de enero de 2016]; Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/112734>
38. Reby D, McComb K. Anatomical constraints generate honesty: acoustic cues to age and weight in the roars of red deer stags. *Anim Behav.* marzo de 2003;65(3):519-30.
39. Geist V. Deer of the world: their evolution, behaviour, and ecology [Internet]. Stackpole Books; 1998 [citado 30 de enero de 2016]. Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=bcWZX-IMEVkc&oi=fnd&pg=PP23&dq=+Deer+of+the+World:+their+Evolution,+Behavior+%26+Ecology+geist&ots=TLIRLGeCLF&sig=nCmhtFLvH7DUnljZHib5ViCZN_8
40. Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O, Kuehn R. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Mol Phylogenet Evol.* junio de 2004;31(3):1064-83.
41. Pérez Legido B, Cerdeño E. Los macromamíferos del Pleistoceno superior de Cueva Millán (Burgos). *Estud Geol.* 1992;48(3-4):187–192.
42. Carranza J. *Cervus elaphus* Linnaeus, 1758. En: Palomo Muñoz LJ, Gisbert J, Blanco Gutiérrez JC, editores. Atlas y libro rojo de los mamíferos de España. Madrid: Organismo Autónomo Parques Nacionales; 2007. p. 586.
43. Carranza J. Aplicaciones de la Etología al manejo de las poblaciones de ciervo en el suroeste de la Península Ibérica: producción y conservación. *Etología.* 1999;7:5–18.
44. Álvarez-Ortí M, Escribano J, Garde J, García A, Ortiz N, Gallego L, et al. Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones cinegéticas de Ciervo Ibérico, *Cervus elaphus hispanicus*, mediante métodos moleculares. *Galemys Bol SECEM.* 1999;11(1):27–39.

45. Rabatsky-Ehr T, Dingman D, Marcus R, Howard R, Kinney A, Mshar P. Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(5):525.
46. Saez-Royuela C, Telleria JL. Reproductive trends of the wild boar (*Sus scrofa*) in Spain. *Folia Zool*. 1987;36(1):21-5.
47. Markina FA, Cortezo R de G, Sáez-Royuela C. Physical development of wild boar in the Cantabric Mountains, Álava, Northern Spain. *Galemys Bol Inf Soc Esp Para Conserv Estud Los Mamíferos*. 2004;16(1):25-34.
48. Herrero J. Adaptación funcional del jabalí *Sus scrofa* L. a un ecosistema forestal y a un sistema agrario intensivo en Aragón [Internet]. [Alcalá de Henares]: Universidad De Alcalá; 2002 [citado 31 de enero de 2016]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300091675>
49. Fernández-Llario P. Jabalí—*Sus scrofa* Linnaeus, 1758. *Encicl Virtual Los Vertebr Esp Carrascal LM Salvador AEds Mus Nac Cienc Nat Madr Httpwww Vertebr Org* [Internet]. 2006 [citado 30 de enero de 2016]; Disponible en: http://www.revilladepomar.net/web/fauna_local/mamiferos/jabali.pdf
50. Fernández-Llario P, Mateos-Quesada P. Udder preference in wild boar piglets. *Acta Ethologica*. 10 de mayo de 2005;8(1):51-5.
51. Cahill S, Llimona F, Gràcia J. Spacing and nocturnal activity of wild boar *Sus scrofa* in a Mediterranean metropolitan park. *Wildl Biol*. 2003;9(1):3–13.
52. Venero JL. Dieta de los grandes fitófagos silvestres del Parque Nacional de Doñana, España. *Doñana Acta Vertebr*. 1984;11(3):1–130.
53. Abáigar T. Régimen alimentario del jabalí (*Sus scrofa*, L. 1758) en el sureste ibérico. *Doñana Acta Vertebr*. 1993;20(1):35–48.
54. Saenz de Buruaga M. Alimentacion del jabali (*Sus scrofa castilianus*) en el norte de Espana. *Ecologia* [Internet]. 1995 [citado 31 de enero de 2016]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES19960058333>
55. Herrero J, Couto S, Rosell C, Arias P. Preliminary data on the diet of wild boar living in a Mediterranean coastal wetland. *Galemys Bol Inf Soc Esp Para Conserv Estud Los Mamíferos*. 2004;16(1):115-23.
56. Fernandez-Llario P, Mateos-Quesada P. Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriol (Warsz)*. 1998;43:439–444.

57. Markina FA, Sáez-Royuela C, De Garnica R. Fenología reproductiva del jabalí (*Sus scrofa* L.) en las montañas cantábricas (Álava, Norte de España). *Galemys*. 2003;15:145–155.
58. Aparicio M, Andrés MÁ de, Piñeiro C, Rodríguez V. Análisis de parámetros reproductivos del cerdo ibérico. Primera propuesta para establecer los niveles de referencia. *Anaporc* 2004. 2011;8(78):40–45.
59. Gamelon M, Besnard A, Gaillard J-M, Servanty S, Baubet E, Brandt S, et al. High Hunting Pressure Selects for Earlier Birth Date: Wild Boar as a Case Study. *Evolution*. 1 de noviembre de 2011;65(11):3100-12.
60. Fernández-Llario P. Ecología del jabalí en Doñana: parámetros reproductivos e impacto ambiental. Univ Extremad Cáceres. 1996;
61. Jensen P, Algers B. An ethogram of piglet vocalizations during suckling. *Appl Anim Ethol*. enero de 1984;11(3):237-48.
62. Weary DM, Braithwaite LA, Fraser D. Vocal response to pain in piglets. *Appl Anim Behav Sci*. marzo de 1998;56(2–4):161-72.
63. Granado AM, Sánchez EVM, Martínez MCV, Serrano LPS, Banegas PO, Frías AT, et al. Vigilancia epidemiológica de brotes de triquinosis en España. Temporadas 1994/1995 a 2005/2006. *Bol Epidemiológico Sem*. 1 de marzo de 2012;15(4):37-40.
64. Daszkiewicz T, Janiszewski P, Wajda S. Quality Characteristics of Meat from Wild Red Deer (*cervus Elaphus* L.) Hinds and Stags. *J Muscle Foods*. 1 de octubre de 2009;20(4):428-48.
65. Wiklund E, Manley TR, Littlejohn RP, Stevenson-Barry JM. Fatty acid composition and sensory quality of *Musculus longissimus* and carcass parameters in red deer (*Cervus elaphus*) grazed on natural pasture or fed a commercial feed mixture. *J Sci Food Agric*. 1 de abril de 2003;83(5):419-24.
66. Dransfield E. Consumer acceptance - meat quality aspects. En *Agricultural Research Council (ARC)*; 2003. p. 146-59.
67. Ngapo TM, Dransfield E. British consumers preferred fatness levels in beef: Surveys from 1955, 1982 and 2002. *Food Qual Prefer*. julio de 2006;17(5):412-7.

-
68. Adzitey F, Nurul H. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: Causes and measures to reduce these incidences-a mini review. *Int Food Res J*. 2011;18(1):11–20.
69. Warriss PD. Meat science [Internet]. Cabi; 2001 [citado 12 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=N-bzTWCi8LkC&oi=fnd&pg=PR5&dq=meat+science:+an+introductory+text+CAB-International&ots=laXGIzXkNB&sig=Q3heY3p8dbozWgfcHjvKLIYUWc0>
70. Viljoen HF, de Kock HL, Webb EC. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. *Meat Sci*. junio de 2002;61(2):181-5.
71. Mounier L, Dubroeuq H, Andanson S, Veissier I. Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *J Anim Sci*. 1 de junio de 2006;84(6):1567-76.
72. Campo JL, Gil MG, Dávila SG. El bienestar de los animales domésticos [Internet]. 2002 [citado 12 de marzo de 2016]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Maria_GARCIA-GIL/publication/267362679_EL_BIENESTAR_DE_LOS_ANIMALES_DOMSTICOS/links/544fa6030cf2bca5ce92ac21.pdf
73. Hoffman LC. The effect of different culling methodologies on the physical meat quality attributes of various game species. En: Ebedes H, Reilly B, van Hoven W, Penzhorn B, editores. Pretoria; 2001. p. 212-21.
74. Hoffman LC. The effect of daytime cropping on warthog (*Phacocerus aethiopicus*) meat quality. En Cracovia; 2001. p. 70-1.
75. Kritzinger B, Hoffman LC, Ferreira AV. A comparison between the effects of two cropping methods on the meat quality of impala (*Aepyceros melampus*). *South Afr J Anim Sci*. 2004;33(4):233-41.
76. Parlamento Europeo. Normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. RE, 853/2004 2004.
77. Wiklund E, Malmfors G. The effects of pre-slaughter handling on reindeer meat quality—a review. En: Animal Breeding Abstracts [Internet]. 2004 [citado 14 de marzo de 2016]. p. 1N–6N. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Eva_Wiklund/publication/269574400_The_effects_of_pre-slaughter_handling_on_reindeer_meat_quality_-_a_review/links/54982a5d0cf2c5a7e342a24a.pdf

78. Martín J. Venison Deer: un ejemplo de producción de añojo de ciervo. PR Pequeños Rumiantes. 2008;9(1):24–28.
79. Madrid A. Cinco granjas crean la primera empresa española de crianza de ciervos para producción de carne [Internet]. heraldo.es. 2015 [citado 24 de julio de 2016]. Disponible en: http://www.heraldo.es/noticias/suplementos/heraldo_del_campo/2015/01/18/cinco_granjas_crear_primera_empresa_crianza_ciervos_para_produccion_carne_333480_1431024.html
80. EFE. Constituida la Asociación Española de Salas de Tratamiento de Carne [Internet]. abc. 2015 [citado 24 de septiembre de 2016]. Disponible en: <http://www.abc.es/comunidad-castillalamancha/20150914/abcp-constituida-asociacion-espanola-salas-20150914.html>
81. Zomborszky Z, Szentmihályi G, Sarudi I, Horn P, Szabo CS. Nutrient composition of muscles in deer and boar. J Food Sci. 1996;61(3):625–627.
82. Sales J, Kotrba R. Meat from wild boar (*Sus scrofa* L.): A review. Meat Sci. junio de 2013;94(2):187-201.
83. Postolache NA, Lazăr R, Boișteanu CP. Researches on the characterization of physical and chemical parameters of refrigerated meat from wild boar sampled From the NE part of Romania. Lucr Științ. 2011;54:193–197.
84. Hoffman LC, Cawthorn DM. What is the role and contribution of meat from wildlife in providing high quality protein for consumption. Anim Front. 2012;2(4):40–53.
85. Aidoo KE, Haworth RJP. Nutritional and chemical composition of farmed venison. J Hum Nutr Diet. 1 de diciembre de 1995;8(6):441-6.
86. Volpelli LA, Valusso R, Morgante M, Pittia P, Piasentier E. Meat quality in male fallow deer (*Dama dama*): effects of age and supplementary feeding. Meat Sci. septiembre de 2003;65(1):555-62.
87. Wiklund E, Finstad G, Johansson L, Aguiar G, Bechtel PJ. Carcass composition and yield of Alaskan reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) steers and effects of electrical stimulation applied during field slaughter on meat quality. Meat Sci. marzo de 2008;78(3):185-93.
88. Hoffman LC, Mostert AC, Kidd M, Laubscher LL. Meat quality of kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) and impala (*Aepyceros melampus*): Carcass yield, physical quality and chemical composition of kudu and impala Longissimus dorsi

- muscle as affected by gender and age. Meat Sci. diciembre de 2009;83(4):788-95.
89. Onyango CA, Izumimoto M, Kutima PM. Comparison of some physical and chemical properties of selected game meats. Meat Sci. mayo de 1998;49(1):117-25.
90. Ruiz J, Martín D, Ventanas S, Martín A. Calidad de la carne de caza. Carnes Extremad Caza Extremad Ed Serv Publicaciones Junta Extremad Pp. 2006;105–120.
91. Quaresma MAG, Trigo-Rodrigues I, Alves SP, Martins SIV, Barreto AS, Bessa RJB. Nutritional evaluation of the lipid fraction of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) tenderloin. Meat Sci. diciembre de 2012;92(4):519-24.
92. Van Zyl L, Ferreira AV. Physical and chemical carcass composition of springbok (*Antidorcas marsupialis*), blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and impala (*Aepyceros melampus*). Small Rumin Res. junio de 2004;53(1–2):103-9.
93. Fong DW. Seasonal Variation of Marrow Fat Content from Newfoundland Moose. J Wildl Manag. 1981;45(2):545-8.
94. Holand Ø. Seasonal variation in body composition of European roe deer. Can J Zool. 1 de marzo de 1992;70(3):502-4.
95. Williams CD, Whitley BM, Hoyo C, Grant DJ, Iraggi JD, Newman KA, et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. Nutr Res N Y N. enero de 2011;31(1):1-8.
96. Terry PD, Rohan TE, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. Am J Clin Nutr. 1 de marzo de 2003;77(3):532-43.
97. Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. Am J Clin Nutr. 1 de junio de 2004;79(6):935-45.
98. Rose DP. Dietary Fatty Acids and Prevention of Hormone-Responsive Cancer. Exp Biol Med. 1 de noviembre de 1997;216(2):224-33.

99. Zarkadas C g., Marshall W d., Khalili A d., Nguyen Q, Zarkadas G c., Karatzas C n., et al. Mineral Composition of Selected Bovine, Porcine and Avian Muscles, and Meat Products. J Food Sci. 1 de mayo de 1987;52(3):520-5.
100. Dubey JP. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. J Eukaryot Microbiol. 1 de noviembre de 2008;55(6):467-75.
101. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci. 25 de julio de 2006;103(30):11423-8.
102. Wolf A, Cowen D, Paige B. Human Toxoplasmosis : Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. Am Assoc Adv Sci Sci. 10 de marzo de 1939;89(2306):226-227 pp.
103. Dubey JP, Velmurugan GV, Ulrich V, Gill J, Carstensen M, Sundar N, et al. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from fetuses of different gestational ages. Int J Parasitol. julio de 2008;38(8–9):1057-63.
104. Weinman D, Chandler AH. Toxoplasmosis in Swine and Rodents. Reciprocal Oral Infection and Potential Human Hazard. Proc Soc Exp Biol Med. octubre de 1954;87(1):211-6.
105. Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M. Étude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Rev Fr Clin Biol. 1965;10(9):952.
106. Hutchison WM. Experimental Transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature. 29 de mayo de 1965;206(4987):961-2.
107. Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical Felidae. Am J Trop Med Hyg. 1972;21(5; Pt 1):512-7.
108. Derouin F, Bultel C, Roze S, others. Toxoplasmose: état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapp Groupe Trav Toxoplasma Gondii. 2005;
109. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;(363):1965-76.
110. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. Int J Parasitol. octubre de 2008;38(12):1359-70.

111. Goldstein EJC, Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. Clin Infect Dis. 15 de agosto de 2008;47(4):554-66.
112. Sacks JJ, Delgado DG, Lobel HO, Parker RL. Toxoplasmosis Infection Associated with Eating Undercooked Venison. Am J Epidemiol. 1 de diciembre de 1983;118(6):832-8.
113. Ross RD, Stec LA, Werner JC, Blumenkranz MS, Glazer L, Williams GA. Presumed acquired ocular toxoplasmosis in deer hunters. LWW [Internet]. 2001 [citado 26 de marzo de 2016]; Disponible en: http://journals.lww.com/retinajournal/Fulltext/2001/06000/PRESUMED_ACQUIRED_OCULAR_TOXOPLASMOSIS_IN_DEER.5.aspx
114. Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Ruiz F, Vicente J, Marco I, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. Vet Parasitol. 15 de julio de 2005;131(1-2):151-6.
115. Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Cabezón O, Ruiz-Fons F, Vicente J, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. Vet Parasitol. 31 de marzo de 2006;136(3-4):193-200.
116. Ambrosioni J, Cecchini D, Castellaro P, Biscione F, Lloveras S, Orduna T. Triquinosis: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Estudio retrospectivo a 10 años (1994-2003). Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. septiembre de 2006;24(7):440-4.
117. de Boni U, Lenczner MM, Scott JW. Autopsy of an Egyptian mummy. 6. *Trichinella spiralis* cyst. Can Med Assoc J. 3 de septiembre de 1977;117(5):472.
118. Kagan IG. Trichinosis: a review of biologic, serologic and immunologic aspects. J Infect Dis. 1960;107(1):65-93.
119. Glazier WCW. Report on trichinae and trichinosis. US Government Printing Office; 1881.
120. Sáiz Moreno L. Historiografía de dos importantes zoonosis: triquinosis y lepra (cisticercosis porcina). II. Lepra del cerdo y/o cisticercosis porcina. Rev Sanid E Hig Pública. 1987;61(11-12):1147-1158.
121. Murrell KD, Pozio E. Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2194-2202.

122. Wilson NO, Hall RL, Montgomery SP, Jones JL. Trichinellosis surveillance—United States, 2008–2012. *MMWR Surveill Summ.* 2015;64(Suppl 1):1–8.
123. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev.* enero de 2009;22(1):127–45.
124. Ancelle T. Historial de los brotes de triquinososis ligados al consumo de carne de caballo, 1975-1998. *Euro Surveill* [Internet]. 8 de enero de 1998 [citado 24 de julio de 2016];1998(8). Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=120&LanguageId=3>
125. Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect Genet Evol.* julio de 2009;9(4):606–16.
126. Zamora MJ, Alvarez M, Olmedo J, Blanco MC, Pozio E. *Trichinella pseudospiralis* in the Iberian peninsula. *Vet Parasitol.* 15 de junio de 2015;210(3–4):255–9.
127. Fernández ARM, Ruiz JN, Salamanca FF. *Trichinella britovi* Pozio et al. 1992, la triquina endémica en los climas templados del viejo mundo. *REDVET Rev Electrónica Vet* [Internet]. 2005 [citado 26 de marzo de 2016];6(5). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505/050512.pdf>
128. Pozio E, La Rosa G, Murrell KD, Lichtenfels JR. Taxonomic Revision of the Genus *Trichinella*. *J Parasitol.* 1992;78(4):654–9.
129. Pozio E. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol.* 21 de octubre de 2007;149(1–2):3–21.
130. Pozio E, La Rosa G, Serrano FJ, Barrat J, Rossi L. Environmental and human influence on the ecology of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Western Europe. *Parasitology.* diciembre de 1996;113(6):527–533.
131. Jefatura del Estado. Bases de Sanidad Nacional. nov 25, 1944.
132. Smigic N, Rajkovic A, Antal E, Medic H, Lipnicka B, Uyttendaele M, et al. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. *Food Microbiol.* septiembre de 2009;26(6):629–37.

133. Sanjuás-Rey M, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Aubourg SP. Microbial Activity Inhibition in Chilled Mackerel (*Scomber Scombrus*) by Employment of an Organic Acid-Icing System. J Food Sci. 1 de mayo de 2012;77(5):M264-9.
134. Marchiori AF, Felício PE de. Quality of wild boar meat and commercial pork. Sci Agric. febrero de 2003;60(1):1-5.
135. Deutz A, Fuchs K, Pless P, Deutz-Pieber U, Köfer J. Hygieniserisiken bei Wildfleisch : Oberflächenkeimgehalte und humanpathogene Keime. Fleischwirtschaft. 2000;80(12):106-8.
136. Paulsen P. Hygiene and microbiology of meat from wild game: an Austrian view. En: Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayer R, Smulders FJM, editores. Game meat hygiene in focus [Internet]. Wageningen Academic Publishers; 2011 [citado 18 de marzo de 2016]. p. 19-37. Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.3920/978-90-8686-723-3_1
137. Mackey BM, Derrick CM. Contamination of the deep tissues of carcasses by bacteria present on the slaughter instruments or in the gut. J Appl Bacteriol. 1 de abril de 1979;46(2):355-66.
138. Fosse J, Seegers H, Magras C. Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. Vet Res. 2008;39(1):1–16.
139. Bertolini R, Zgrablic G, Cuffolo E. Wild Game Meat: Products, Market, Legislation and Processing Controls. Vet Res Commun. 30 de noviembre de 2015;29(2):97-100.
140. Fosse J (INRA, Oudot N (INRA, Laroche M (INRA, Rossero A (INRA, Seegers H (inra, Magras C (INRA. Contamination de lots de porcs par cinq agents de zoonoses alimentaires bactériennes : variabilité en élevage et à l'abattoir. 2008 [citado 18 de marzo de 2016]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2014010690>
141. Winkelmayer R, Malleczek D, Paulsen P, Vodnansky M. Mitteilung zu röntgenaranatomischen untersuchungen des thorax des rehwilds im hinblick auf den optimalen zielpunkt für den tierschutzgerechten und wildfleischhygienisch einwandfreien schuss. Wien Tierärztliche Monatsschrift. 2005;92:40–45.
142. Andral G. Maladies De L'Abdomen. Tercera. Paris: Cavellin; 1834. 716 p.

143. Adams M, Moss M, editores. Chapter 7. Bacterial Agents of Foodborne Illness. En: Food Microbiology [Internet]. 3.^a ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2007 [citado 18 de marzo de 2016]. p. 182-269. Disponible en: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847557940-00182>
144. Garrity G, Staley JT, Boone DR, De Vos P, Goodfellow M, Rainey FA, et al. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria [Internet]. Springer Science & Business Media; 2006 [citado 18 de marzo de 2016]. Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=dgejA4wa5R4C&oi=fnd&pg=PR27&dq=bergey%27s+manual+of+systematic+bacteriology+volume+two&ots=cX0VBKuMcg&sig=eGRgoFzOLH9_paoE1lyUXddTX7k
145. Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, Hermant D. Individualisation d'une septième sode-espèce de salmonella: *s. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. Ann Inst Pasteur Microbiol. 8 de julio de 1986;137(1, Supplement 2):211-7.
146. Le Minor L, Popoff MY. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. Int J Syst Evol Microbiol. 1987;37(4):465-8.
147. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. J Clin Microbiol. 1 de febrero de 1989;27(2):313-20.
148. Blaser MJ, Newman LS. A Review of Human Salmonellosis: I. Infective Dose. Rev Infect Dis. 1 de noviembre de 1982;4(6):1096-106.
149. Atanassova V, Apelt J, Reich F, Klein G. Microbiological quality of freshly shot game in Germany. Meat Sci. abril de 2008;78(4):414-9.
150. Lillehaug A, Bergsjø B, Schau J, Bruheim T, Vikøren T, Handeland K. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. Acta Vet Scand. 2005;46(1):23.
151. Wahlstrom H, Tysen E, Engvall EO, Brandstrom B, Eriksson E, Morner T, et al. Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. Vet Rec. 2003;153(3):74-80.

152. Hartung M. Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2005 bei Lebensmitteln. J Für Verbraucherschutz Leb. diciembre de 2006;1(2):196-204.
153. Jaksic S, Uhital S, Asaj A, Petrak T, Botka-Petrak K. Salmonellen in Wildfleisch. Salmonells Game Meat Allg Forst Jagd-Ztg. 2003;174:57–58.
154. Vieira-Pinto M, Morais L, Caleja C, Themudo P, Torres C, Igrejas G, et al. *Salmonella* spp. in Game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). Foodborne Pathog Dis. 23 de enero de 2011;8(6):739-40.
155. Escherich T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. 1885 [citado 21 de marzo de 2016]; Disponible en: <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/year/2013/docId/19650>
156. EFSA BIOHAZ Panel, EFSA FIP, EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. EFSA J. 2011;9(7):35.
157. EFSA. Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. EFSA J. 2011;9(6):50.
158. EFSA. Statement summarising the Conclusions and Recommendations from the Opinions on the safety of Irradiation of Food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. EFSA J. 2011;9(4):155.
159. Qrskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods Microbiol. 1984;14:43–112.
160. Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae [Internet]. Elsevier Science Publishing Co. Inc.; 1986 [citado 14 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19872036986.html>
161. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. J Pathol Bacteriol. 1 de marzo de 1945;57(2):239-47.
162. Neter E, Westphal O, Lüderitz O, Gino RM, Gorzynski EA, others. Demonstration of Antibodies against Enteropathogenic *Escherichia coli* in Sera of Children of Various Ages. Pediatrics. 1955;16(6):801–8.
163. Cohen MB, Giannella RA. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. En: Infections of the gastrointestinal tract. Raven Press Ltd New York; 1995. p. 229–310.

164. Acheson DWK, Keusch GT. Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect Gastrointest Tract Raven Press N Y. 1995;763–775.
165. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne ROY, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr Infect Dis J. 1987;6(9):829–831.
166. Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1985;48(2):378–383.
167. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun. 1984;45(2):534–536.
168. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. J Bacteriol. 1989;171(8):4281–4289.
169. Lee S-Y. Microbial safety of pickled fruits and vegetables and hurdle technology. Internet J Food Saf. 2004;4:21–32.
170. EFSA Working Group. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic types. EFSA J. 2007;579:1–61.
171. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977;18(3):775–779.
172. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis. 1987;155(3):377–389.
173. Gyles CL. Shiga toxin-producing An overview. J Anim Sci. 2007;85(13_suppl):E45–E62.
174. Kaspar C, Doyle ME, Archer J. Food Safety Review: non-O157: H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Food Res Inst UW-Madison Dispon En Httpfri Wisc EdudocspdfFRIBriefNonO157STEC410 Pdf Acceso 17-10-12. 2009;
175. Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with

- Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol.* 2010;142(3):318–329.
176. Feng PC, Jinneman K, Scheutz F, Monday SR. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6699–6702.
177. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1989;57(4):1290–1298.
178. Sherman P, Soni R, Karmali M. Attaching and effacing adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium in vivo. *Infect Immun.* 1988;56(4):756–761.
179. Hall GA, Dorn CR, Chanter N, Scotland SM, Smith HR, Rowe B. Attaching and effacing lesions in vivo and adhesion to tissue culture cells of Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* belonging to serogroups O5 and O103. *Microbiology.* 1990;136(4):779–786.
180. Louie M, De Azavedo J, Clarke R, Borczyk A, Lior H, Richter M, et al. Sequence heterogeneity of the eae gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol Infect.* 1994;112(3):449–461.
181. Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, et al. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. *Int Microbiol.* 2010;12(4):243–251.
182. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4930–4940.
183. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 1983;308(12):681–685.
184. Comité Científico AESAN. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por

- cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC. AESAN; 2012 sep p. 71-100. Report No.: AESAN-2012-007.
185. Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections. J Infect Dis. 1989;160(6):994–998.
 186. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM. *Escherichia coli* O157: H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. Ann Intern Med. 1997;126(7):505–513.
 187. Rowe PC, Orrbine E, Lior H, Wells GA, Yetisir E, Clulow M, et al. Risk of hemolytic uremic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157: H7 infection: results of a Canadian collaborative study. J Pediatr. 1998;132(5):777–782.
 188. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev. 1991;13(1):60–98.
 189. Jay MT, Cooley M, Carychao D, Wiscomb GW, Sweitzer RA, Crawford-Miksza L, et al. *Escherichia coli* O157: H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. Emerg Infect Dis. 2007;13(12):1908–1911.
 190. Sánchez S, García-Sánchez A, Martínez R, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, et al. Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157: H7 in wild ruminants. Vet J. 2009;180(3):384–388.
 191. Wu G, Carter B, Mafura M, Liebana E, Woodward MJ, Anjum MF. Genetic diversity among *Escherichia coli* O157: H7 isolates and identification of genes linked to human infections. Infect Immun. 2008;76(2):845–856.
 192. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases—the challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol. 2010;139:S3–S15.
 193. Kannali MA, Petric M, Liin C, others. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1985;151:775–782.
 194. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, et al. Non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. J Infect Dis. 2005;192(8):1422–1429.

195. Miko A, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N, Krause G, et al. Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(20):6462–6470.
196. Martin A, Beutin L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *Int J Food Microbiol.* 2011;146(1):99–104.
197. Díaz-Sánchez S, Sánchez S, Sánchez M, Herrera-León S, Hanning I, Vidal D. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in game meat and ready-to-eat meat products. *Int J Food Microbiol.* 15 de noviembre de 2012;160(2):179-82.
198. Roccourt J, Grimont F, Grimont PAD, Seeliger HPR. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato. *Curr Microbiol.* noviembre de 1982;7(6):383-8.
199. Peel M, Donachie W, Shaw A. Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. *Microbiology.* 1988;134(8):2171-8.
200. Dons L, Rasmussen O f., Olsen J e. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 1 de octubre de 1992;6(20):2919-29.
201. Gründling A, Burrack LS, Bouwer HA, Higgins DE. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(33):12318–12323.
202. Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, Rees CED, Waites WM. Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Appl Environ Microbiol.* 1 de febrero de 2000;66(2):860-3.
203. Lado BH, Yousef AE. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. *FOOD Sci Technol-N Y-MARCEL DEKKER-.* 2007;161:157.
204. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* [Internet]. Vol. 3. Springer Science & Business Media; 2011 [citado 20 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=0->

- VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&dq=bergey%27s+manual+of+systematic+bacteriology+volume+three&ots=kGBfzZEq3y&sig=dP9zTICLv7zkjbWC1O38_P-sj44
205. Doyle MP, Glass KA, Beery JT, Garcia GA, Pollard DJ, Schultz RD. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl Environ Microbiol. 1 de julio de 1987;53(7):1433-8.
 206. McLauchlin J, Jones D. *Erysipelothrix* and *Listeria*. Topley Wilson's Microbiol Microb Infect. 1998;2:683–708.
 207. Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. J Infect. enero de 1994;28(1):89-91.
 208. Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J. enero de 1997;153(1):9-29.
 209. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1 de septiembre de 1991;55(3):476-511.
 210. Paulsen P, Winkelmayer R. Seasonal variation in the microbial contamination of game carcasses in an Austrian hunting area. Eur J Wildl Res. 14 de agosto de 2004;50(3):157-9.
 211. Citterio CV, Bragagna P, Novelli E, Giaccone V. Approaches to game hygiene in the province Belluno (Italy): from training to meat microbiology. En: Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayer R, Smulders FJM, editores. Game meat hygiene in focus [Internet]. Wageningen Academic Publishers; 2011 [citado 20 de marzo de 2016]. p. 267-70. Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.3920/978-90-8686-723-3_20
 212. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Indicators of Food Microbial Quality and Safety. En: Modern Food Microbiology [Internet]. Springer US; 2005 [citado 20 de marzo de 2016]. p. 473-95. (Food Science Text Series). Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-23413-6_20
 213. Schardinger F. Über das Vorkommen Gährung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurtheilung desselben. Wien Klin Wochenschr. 1892;5:403–405.
 214. ICMSF. Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Springer London, United Kingdom; 2002.

-
215. Franza T, Mahé B, Expert D. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004 [citado 21 de marzo de 2016]; Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2004.04383.x/full>
216. Gebreyes WA, Altier C. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. *J Clin Microbiol*. 1 de agosto de 2002;40(8):2813-22.
217. Lindberg A-M, Ljungh Å, Ahrné S, Löfdahl S, Molin G. Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *Int J Food Microbiol*. 6 de enero de 1998;39(1–2):11-7.
218. Gault G, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, et al. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104: H4, south-west France, June 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(26):Article2.
219. Decastelli L, Giaccone V, Mignone W. Bacteriological examination of meat of Wild boars shot down in Piedmont and Liguria, Italy. *J Mt Ecol* [Internet]. 17 de septiembre de 2014 [citado 21 de marzo de 2016];3(0). Disponible en: <http://mountainecology.org/index.php/me/article/view/76>
220. Apha. Standard methods for the examination of water and wastewater. Apha; 1985.
221. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(3):925-32.
222. Buttiaux R, Mossel D a. A. The Significance of Various Organisms of Faecal Origin in Foods and Drinking Water. *J Appl Bacteriol*. 1 de diciembre de 1961;24(3):353-64.
223. Stiles ME, Ng LK. Enterobacteriaceae associated with meats and meat handling. *Appl Environ Microbiol*. 1 de abril de 1981;41(4):867-72.
224. Gill CO. Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Sci*. octubre de 2007;77(2):149-60.

225. Schleifer KH, Bell JA. Genus I. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 153.). Bergey's Man Syst Bacteriol Firmicutes. 2009;3:392–421.
226. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerg Infect Dis [Internet]. 2011 [citado 21 de marzo de 2016];17(1). Disponible en: <http://t.perishablepundit.com/docs/foodborneillness.pdf>
227. Uyttendaele M. Microbiologie van voedingsmiddelen. Methoden, principes en criteria. [Internet]. Noordervliet; 2007 [citado 19 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1854/LU-419057>
228. Crabtree JA, Litterer W. Outbreak of Milk Poisoning Due to a Toxin-Producing *Staphylococcus* Found in the Udders of Two Cows*. Am J Public Health Nations Health. 1934;24(11):1116–1122.
229. Le Loir Y, Baron F, Gautier M, others. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003;2(1):63–76.
230. Hackner W. Zum Hygienestatus von Schwarzwildbret aus einem Revier im Süden der fränkischen Alb. Ludwig-Maximilians-Universität; 1990.
231. Hermsen G-J. Qualitative und (semi-) quantitative mikrobiologische Untersuchungen zur Feststellung des Hygienestatus bei Fleischeinfuhren aus Drittländern bei einer Einfuhruntersuchungsstelle. Tierärztliche Hochschule Hannover; 1991.
232. Marucci F, Berno C, Mosso C. Controllo batteriologico delle carni di mufloni selvatici abbattuti a caccia. Ind Aliment. 1997;36(360):748-52.
233. Ziegenfuss J. Hygienestatus von erlegtem Schwarzwild (*Sus scrofa scrofa*) im Wartburgkreis. 2003 [citado 21 de marzo de 2016]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300101858>
234. Bosi E, Madie P, Wilks CR, Fenwick SG. The isolation of Yersinia species from retailed sausages containing venison. N Z Vet J. 2 de enero de 1995;43(1):27-8.
235. Hayashidani H, Kanzaki N, Kaneko Y, Okatani AT, Taniguchi T, Kaneko K, et al. Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in wild boars in Japan. J Wildl Dis. 1 de enero de 2002;38(1):202-5.

-
236. Paulsen P, Hilbert F, Winkelmayr R, Mayrhofer S, Hofbauer P, Smulders FJM. Zur tierärztlichen Fleischuntersuchung von Wild, dargestellt an der Untersuchung von Rehen in Wildfleischbearbeitungsbetrieben. Arch Für Leb. 2003;54(5-6):137-40.
237. Siemer BL, Nielsen EM, On SLW. Identification and Molecular Epidemiology of *Campylobacter coli* Isolates from Human Gastroenteritis, Food, and Animal Sources by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Penner Serotyping. Appl Environ Microbiol. 1 de abril de 2005;71(4):1953-8.
238. Membré J-M, Laroche M, Magras C. Assessment of levels of bacterial contamination of large wild game meat in Europe. Food Microbiol. 2011;28:1072-9.
239. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E Virus Infection. Clin Microbiol Rev. 1 de enero de 2014;27(1):116-38.
240. Tomiyama D, Inoue E, Osawa Y, Okazaki K. Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan. J Viral Hepat. 1 de julio de 2009;16(7):524-8.
241. Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknegt M, et al. Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. J Virol Methods. septiembre de 2010;168(1-2):197-206.
242. Kukiela D, Rodríguez-Prieto V, Vicente J, Sánchez-Vizcaíno JM. Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission. Transbound Emerg Dis. 1 de enero de 2015;n/a-n/a.
243. Larska M, Krzysiak MK, Jabłoński A, Kęsik J, Bednarski M, Rola J. Hepatitis E Virus Antibody Prevalence in Wildlife in Poland. Zoonoses Public Health. 1 de marzo de 2015;62(2):105-10.
244. Martinelli N, Pavoni E, Filogari D, Ferrari N, Chiari M, Canelli E, et al. Hepatitis E Virus in Wild Boar in the Central Northern Part of Italy. Transbound Emerg Dis. 1 de abril de 2015;62(2):217-22.
245. Pipová M, Jevinová P, Kmet' V, Regecová I, Marušková K. Antimicrobial resistance and species identification of staphylococci isolated from the meat of

- wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Slovakia. Eur J Wildl Res. 2012;58(1):157–165.
246. Danieli PP, Serrani F, Primi R, Ponzetta MP, Ronchi B, Amici A. Cadmium, Lead, and Chromium in Large Game: A Local-Scale Exposure Assessment for Hunters Consuming Meat and Liver of Wild Boar. Arch Environ Contam Toxicol. 22 de agosto de 2012;63(4):612-27.
247. Pokorny B. Roe deer (*Capreolus capreolus* L.) antlers as an accumulative and reactive bioindicator of lead pollution near the largest Slovene thermal power plant. Vet Arh. 2006;76:S131–S142.
248. Berzas Nevado JJ, Rodríguez Martín-Doimeadios RC, Mateo R, Rodríguez Fariñas N, Rodríguez-Estival J, Patiño Ropero MJ. Mercury exposure and mechanism of response in large game using the Almadén mercury mining area (Spain) as a case study. Environ Res. enero de 2012;112:58-66.
249. Soler F, Gallego E, Hernández R, De Jesús T, Pérez M. Metales pesados en la carne de caza. Linde Rivera. 2007;45:78–85.
250. Morales JSS, Rojas RM, Pérez-Rodríguez F, Casas AA, López MAA. Risk assessment of the lead intake by consumption of red deer and wild boar meat in Southern Spain. Food Addit Contam Part A. 1 de agosto de 2011;28(8):1021-33.
251. Saïdi SA, Azaza MS, Windmolders P, van Pelt J, El-Feki A. Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: An in vitro study in human and rat liver cell lines. Exp Toxicol Pathol. noviembre de 2013;65(7–8):1025-33.
252. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. Interdiscip Toxicol. 2016;8(2):55–64.
253. Comisión Europea. Reglamento (CE) de la comisión, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. 1881/2006 de enero de, 2007 p. 19.
254. Sevillano Morales J. Metales pesados en especies cinegéticas de caza mayor: estudio epidemiológico y riesgo alimentario [Internet]. Universidad de Córdoba; 2013 [citado 22 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/11411>

-
255. Pacyna JM, Pacyna EG. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ Rev.* 1 de diciembre de 2001;9(4):269-98.
256. Scheuhammer AM. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environ Pollut.* 1987;46(4):263-95.
257. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, Yolton K, Baghurst P, Bellinger DC, et al. Low-Level Environmental Lead Exposure and Children's Intellectual Function: An International Pooled Analysis. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):894-9.
258. Andrée S, Jira W, Schwind K-H, Wagner H, Schwägele F. Chemical safety of meat and meat products. *Meat Sci.* septiembre de 2010;86(1):38-48.
259. Iqbal S, Blumenthal W, Kennedy C, Yip FY, Pickard S, Flanders WD, et al. Hunting with lead: Association between blood lead levels and wild game consumption. *Environ Res.* noviembre de 2009;109(8):952-9.
260. Joint FAO, Additives WEC on F, others. Evaluation of certain food additives: sixty-third report of the Joint FA. 2005 [citado 23 de marzo de 2016]; Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43141>
261. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, Domenico AD, et al. Cadmium in food-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 2009;980:1–139.
262. Llanas de Niubó R. Un aspecto especial de las leyes de partida. *Montes.* 1960;(96):557-8.
263. Pérez Vicente I. Legislación cinegética en España: Evolución y actualidad. *Agric Soc.* 1991;(58):173–186.
264. Llanas de Niubó R. Las ordenanzas de Carlos IV. *Montes.* 1964;(115):41-2.
265. ASICCAZA. El sector en cifras [Internet]. ASICCAZA - Asociación Interprofesional de la Carne de Caza. [citado 2 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://www.asiccaza.org/el-sector-de-la-carne-de-caza/el-sector-en-cifras.html>
266. McAfee AJ, McSorley EM, Cuskelly GJ, Moss BW, Wallace JMW, Bonham MP, et al. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Sci.* enero de 2010;84(1):1-13.
267. Comisión Europea. Reglamento 1441/2007 (CE) de la COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión

- de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 2073 dic 27, 2007.
268. Comisión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne. 2015/1375 ago 31, 2015.
269. Parlamento Europeo. Sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Diario Oficial de la Unión Europea, 1169/2001 dic 13, 2014.
270. Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H, et al. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Anim Genet*. 28 de junio de 2001;32(3):139-47.
271. Slate J, Stijn TCV, Anderson RM, McEwan KM, Maqbool NJ, Mathias HC, et al. A Deer (Subfamily Cervinae) Genetic Linkage Map and the Evolution of Ruminant Genomes. *Genetics*. 1 de abril de 2002;160(4):1587-97.
272. Moreiras O, Carbajal Á, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. 17.^a ed. Pirámide; 2015.
273. USDA. Foods List [Internet]. USDA Food Composition Databases. 2016 [citado 25 de septiembre de 2016]. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>
274. Jefatura del Estado. Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. LO, 15/99 ene 14, 2000.
275. Jefatura del Estado. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. 14/2007 jul 4, 2007.
276. Ray B, Speck ML. Freeze-Injury in Bacteria. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 1 de enero de 1973;4(2):161-213.
277. Speck ML, Ray B. Effects of Freezing and Storage on Microorganisms in Frozen Foods: A Review. *J Food Prot*. 1 de mayo de 1977;40(5):333-6.
278. Tortorello ML. Indicator Organisms for Safety and Quality—Uses and Methods for Detection: Minireview. *J AOAC Int*. 1 de noviembre de 2003;86(6):1208-17.

-
279. Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, Daube G. Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. *J Food Prot.* 1 de enero de 2008;71(1):35-45.
280. ISO. UNE-EN ISO 4833-1:2014. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad. 2014.
281. ISO. UNE-EN ISO 4833-2:2014. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en superficie. (ISO 4833-2:2013). 2014.
282. AFNOR. Validation certificate for alternative analytical method according to standard en ISO 16140:2003. TEMPO TVC [Internet]. 2005 [citado 8 de agosto de 2016]. Disponible en: http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/BIO-12-15-09-05_en.pdf
283. Crowley ES, Bird PM, Torontali MK, Agin JR, Goins DG, Johnson R. TEMPO® TVC for the Enumeration of Aerobic Mesophilic Flora in Foods: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 1 de enero de 2008;92(1):165-74.
284. Johnson J. Predictive microorganisms as an indication of pathogen contamination. En: *Proc Recip Meat Conf.* 1996. p. 138–143.
285. Ruby JR, Ingham SC. Use of Enterobacteriaceae Analysis Results for Predicting Absence of *Salmonella* Serovars on Beef Carcasses. *J Food Prot.* 1 de febrero de 2009;72(2):260-6.
286. ISO. ISO 21528-2:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs-- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method. 2004.
287. AFNOR. TEMPO EB validated for the enumeration of Enterobacteriaceae. [Internet]. 2014 [citado 8 de agosto de 2016]. Disponible en: http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/BIO-12-21-12-06_en.pdf
288. Owen M, Willis C, Lamph D. Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. *J Appl Microbiol.* 1 de noviembre de 2010;109(5):1810-6.

289. Filimon MN, Borozan A, Bordean D, Radu F, Popescu R. Microorganisms, qualitative indicators for meat products. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol*. 2010;43(2):346–349.
290. Mead G, Mead GC, others. Faecal indicator organisms for red meat and poultry. *Microbiol Anal Red Meat Poult Eggs*. 2007;83–97.
291. AFNOR. Validation certificate for alternative analytical method according to standard en ISO 16140:2003. TEMPO TC. [Internet]. 2005 [citado 8 de agosto de 2016]. Disponible en: http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/BIO-12-17-12-05_en.pdf
292. Nauta M, Barfod K, Hald T, Sørensen AH, Emborg H-D, Aabo S. Prediction of *Salmonella* carcass contamination by a comparative quantitative analysis of *E. coli* and *Salmonella* during pig slaughter. *Int J Food Microbiol*. 2 de septiembre de 2013;166(2):231-7.
293. Pérez-Rodríguez F, Castro R, Posada-Izquierdo GD, Valero A, Carrasco E, García-Gimeno RM, et al. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Sci*. octubre de 2010;86(2):479-85.
294. Bohaychuk VM, Gensler GE, Barrios PR. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Can Vet J*. octubre de 2011;52(10):1095-100.
295. Manafi M, Kremsmaier B. Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157: H7 in food. *Int J Food Microbiol*. 2001;71(2):257–262.
296. Díaz S, Vidal D, Herrera-León S, Sánchez S. Sorbitol-Fermenting, β -Glucuronidase–Positive, Shiga Toxin–Negative *Escherichia coli* O157:H7 in Free-Ranging Red Deer in South-Central Spain. *Foodborne Pathog Dis*. 5 de agosto de 2011;8(12):1313-5.
297. ISO. ISO 16649-1:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. 2012.
298. ISO. ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part

- 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. 2012.
299. AFNOR. TEMPO EC validated for the enumeration of *Escherichia coli*. 2012.
300. Crowley E, Bird P, Torontali M, Goetz K, Agin J, Goins D, et al. TEMPO® EC for the Enumeration of *Escherichia coli* in Foods: Collaborative Study. J AOAC Int. 1 de abril de 2010;93(2):576-86.
301. ISO. UNE-EN ISO 6888-1:2000. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica que utiliza el medio agar de Baird-Parker (ISO 6888-1:1999). 2015.
302. ISO. UNE-EN ISO 6888-2:2000. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 2: Técnica que utiliza el medio de agar de plasma de conejo y fibrinógeno. ISO 6888-2:1999). 2015.
303. AFNOR. TEMPO STA validated for the enumeration of coagulase-positive staphylococci. [Internet]. 2014 [citado 10 de agosto de 2016]. Disponible en: http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/BIO-12-28-04-10_en.pdf
304. ISO. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 2012.
305. Crowley E, Bird P, Fisher K, Goetz K, Benzinger J M Joseph, Agin J, et al. Evaluation of VIDAS® *Salmonella* (SLM) Easy *Salmonella* Method for the Detection of *Salmonella* in a Variety of Foods: Collaborative Study. J AOAC Int. 1 de noviembre de 2011;94(6):1821-34.
306. McMahon WA, Schultz AM, Johnson RL. Evaluation of VIDAS® *Salmonella* (SLM) Immunoassay Method with Rappaport-Vassiliadis (RV) Medium for Detection of *Salmonella* in Foods: Collaborative Study. J AOAC Int. 1 de julio de 2004;87(4):867-83.
307. Yeh K-S, Tsai C-E, Chen S-P, Liao C-W. Comparison between VIDAS Automatic Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay and Culture Method for *Salmonella* Recovery from Pork Carcass Sponge Samples. J Food Prot. 1 de octubre de 2002;65(10):1656-9.

308. Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK, Renter DG. A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Salmonella* in a Wide Variety of Food and Food-Animal Matrices. J Food Prot. 1 de mayo de 2007;70(5):1080-7.
309. Ellingson JLE, Anderson JL, Carlson SA, Sharma VK. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. Mol Cell Probes. febrero de 2004;18(1):51-7.
310. Donnelly CW. *Listeria monocytogenes*: a Continuing Challenge. Nutr Rev. 1 de junio de 2001;59(6):183-94.
311. ISO. ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method. 1998.
312. Paton AW, Paton JC. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx 1*, *stx 2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. J Clin Microbiol. 1998;36(2):598–602.
313. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, et al. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. N Engl J Med. 10 de noviembre de 2011;365(19):1771-80.
314. Comisión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) n° 208/2013 de 11 de marzo de 2013 sobre requisitos en materia de trazabilidad de los brotes y de las semillas destinadas a la producción de brotes. 208/2013 ene 7, 2013.
315. Nagano H, Hirochi T, Fujita K, Wakamori Y, Takeshi K, Yano S. Phenotypic and genotypic characterization of β -d-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 isolates from deer. J Med Microbiol. 2004;53(10):1037-43.
316. García-Sánchez A, Sánchez S, Rubio R, Pereira G, Alonso JM, Hermoso de Mendoza J, et al. Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. Vet Microbiol. 15 de abril de 2007;121(3–4):373-7.
317. ISO. ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. 2012.

-
318. Valadez AM, Debroy C, Dudley E, Cutter CN. Multiplex PCR Detection of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Strains Belonging to Serogroups O157, O103, O91, O113, O145, O111, and O26 Experimentally Inoculated in Beef Carcass Swabs, Beef Trim, and Ground Beef. *J Food Prot.* 1 de febrero de 2011;74(2):228-39.
319. Hara-Kudo Y, Konishi N, Ohtsuka K, Iwabuchi K, Kikuchi R, Isobe J, et al. An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *Int J Food Microbiol.* 2 de agosto de 2016;230:81-8.
320. Benedict R. Determination of nitrogen and protein content of meat and meat products. *J - Assoc Off Anal Chem.* 1987 de 1986;70(1):69-74.
321. Dulley JR, Grieve PA. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem.* 1 de marzo de 1975;64(1):136-41.
322. Whitaker JR, Granum PE. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal Biochem.* 1980;109(1):156–159.
323. Lynch JM, Barbano DM. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *J-Aoac Int.* 1999;82:1389–1398.
324. Chang SKC. Protein Analysis. En: *Food Analysis* [Internet]. Springer US; 2010 [citado 15 de agosto de 2016]. p. 133-46. (Food Analysis). Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-1478-1_9
325. Sweeney S, Rexroad P. Comparison of LECO FP-228 «nitrogen determinator» with AOAC copper catalyst Kjeldahl method for crude protein. *J - Assoc Off Anal Chem.* 1987 de 1986;70(6):1028-30.
326. Ali LH, Angyal G, Weaver CM, Rader JI. Comparison of capillary column gas chromatographic and AOAC gravimetric procedures for total fat and distribution of fatty acids in foods. *Food Chem.* 1 de enero de 1997;58(1):149-60.
327. Shin J-M, Hwang Y-O, Tu O-J, Jo H-B, Kim J-H, Chae Y-Z, et al. Comparison of different methods to quantify fat classes in bakery products. *Food Chem.* 15 de enero de 2013;136(2):703-9.

- 328. Zhao M, Downey G, O'Donnell CP. Exploration of microwave dielectric and near infrared spectroscopy with multivariate data analysis for fat content determination in ground beef. *Food Control*. octubre de 2016;68:260-70.
- 329. Pérez-Palacios T, Ruiz J, Martín D, Muriel E, Antequera T. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chem*. 15 de octubre de 2008;110(4):1025-9.
- 330. Isengard H-D, Kling R, Reh CT. Proposal of a new reference method to determine the water content of dried dairy products. *Food Chem*. junio de 2006;96(3):418-22.
- 331. Rudi T, Guthausen G, Burk W, Reh CT, Isengard H-D. Simultaneous determination of fat and water content in caramel using time domain NMR. *Food Chem*. 15 de febrero de 2008;106(4):1375-8.
- 332. Marques ÍE, Lucion FB, Bizzi CA, Cichoski AJ, Wagner R, de Menezes CR, et al. Are Infrared and Microwave Drying Suitable Alternatives for Moisture Determination of Meat Products? *J Food Qual*. 1 de agosto de 2016;39(4):391-7.
- 333. Perez D, Andujar G. Determination of ash content in meat products. *Meat Sci*. 1 de mayo de 1981;5(3):165-70.
- 334. Southgate D a. T, Durnin JVGA. Calorie conversion factors. An experimental reassessment of the factors used in the calculation of the energy value of human diets. *Br J Nutr*. junio de 1970;24(2):517–535.
- 335. Nichols BL. Atwater and USDA nutrition research and service: a prologue of the past century. *J Nutr*. septiembre de 1994;124(9 Suppl):1718S-1727S.
- 336. Kruskall LJ, Campbell WW, Evans WJ. The Atwater Energy Equivalents Overestimate Metabolizable Energy Intake in Older Humans: Results from a 96-Day Strictly Controlled Feeding Study. *J Nutr*. 1 de agosto de 2003;133(8):2581-4.
- 337. Kim E, Choi J, Kim H. Mabolizable energy differences between values calculated using energy conversion factors and actual values determined by metabolic study of Korean starch foods. *J Food Sci*. abril de 2014;79(4):H713-718.
- 338. Snijders JMA, Janssen MHW, Gerats GE, Corstiaensen GP. A comparative study of sampling techniques for monitoring carcass contamination. *Int J Food Microbiol*. 1 de diciembre de 1984;1(4):229-36.

-
339. Hutchison ML, Walters LD, Avery SM, Reid C-A, Wilson D, Howell M, et al. A Comparison of Wet-Dry Swabbing and Excision Sampling Methods for Microbiological Testing of Bovine, Porcine, and Ovine Carcasses at Red Meat Slaughterhouses. *J Food Prot.* 1 de octubre de 2005;68(10):2155-62.
340. ISO. ISO 17604:2015. Microbiology of the food chain. Carcass sampling for microbiological analysis. 2015.
341. Obwegeser T, Stephan R, Hofer E, Zweifel C. Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. *Vet Microbiol.* 14 de septiembre de 2012;159(1–2):149-54.
342. Türck N-C. Sensorische und mikrobiologische Untersuchungen zur Beurteilung von Wildfleisch [Internet]. [Hannover]; 2008 [citado 18 de agosto de 2016]. Disponible en: http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/tuerckn_ws08.pdf
343. Avagnina A, Nucera D, Grassi MA, Ferroglio E, Dalmaso A, Civera T. The microbiological conditions of carcasses from large game animals in Italy. *Meat Sci.* julio de 2012;91(3):266-71.
344. Davies AR, Board RJ, Board RG. Microbiology of meat and poultry [Internet]. Springer Science & Business Media; 1998 [citado 16 de agosto de 2016]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=w3adQSPSrD8C&oi=fnd&pg=PR9&dq=microbiology+processed+meat+&ots=kbOsehCTJ5&sig=TNwqayNv6URB6mm9vTa8MfrPPnY>
345. Esmer OK, Irkin R, Degirmencioglu N, Degirmencioglu A. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Sci.* junio de 2011;88(2):221-6.
346. Borilova G, Hulankova R, Svobodova I, Jezek F, Hutarova Z, Vecerek V, et al. The effect of storage conditions on the hygiene and sensory status of wild boar meat. *Meat Sci.* 2016;118:71–77.
347. Wacheck S. Mikrobiologische und sensorische Untersuchung tiefgefrorenen Wildbrets im Hinblick auf die Festlegung mikrobiologischer Richtwerte [Internet]. [München]: München; 2008 [citado 24 de agosto de 2016]. Disponible en: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/8168/1/Wacheck_Silke.pdf

348. Mirceta J, Petrovic J, Blagojevic B, Malesevic M, Antic D. The Microbiological Status of Carcasses from Wild Boar in Serbia. *Procedia Food Sci.* 1 de enero de 2015;5:199-202.
349. Liepiņa S, Jemeljanovs A, Konošonoka IH, others. Wild animals meat pollution by microbial agents in Latvia. En: *Animals, health, food hygiene Proceedings of Conference on« Current events in veterinary research and practice»*, Jelgava, Latvia, 22-23 November 2012. Latvia University of Agriculture; 2012.
350. Bensink J, Ekaputra I, Taliotis C. The isolation of *Salmonella* from kangaroos and feral pigs processed for human consumption. *Aust Vet J.* 1 de marzo de 1991;68(3):106-7.
351. Naya Y, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M. Bacteriological and Genetic Assessment of Game Meat from Japanese Wild Boars. *J Agric Food Chem.* 1 de enero de 2003;51(2):345-9.
352. Paulsen P, Smulders FJM, Hilbert F. *Salmonella* in meat from hunted game: A Central European perspective. *Food Res Int.* marzo de 2012;45(2):609-16.
353. Mackintosh C, Haigh JC, Griffin F. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev Sci Tech-Off Int Épizooties.* 2002;21(1):249–264.
354. Díaz-Sánchez S, Sánchez S, Herrera-León S, Porrero C, Blanco J, Dahbi G, et al. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: Relationship with management practices and livestock influence. *Vet Microbiol.* 3 de mayo de 2013;163(3–4):274-81.
355. Rodas EMF, Bogdanova T, Bossù T, Pecchi S, Tomassetti F, Santis PD, et al. Microbiological assessment of freshly-shot wild boars meat in Lazio Region, Viterbo territory: a preliminary study. *Ital J Food Saf [Internet].* 4 de marzo de 2014 [citado 27 de agosto de 2016];3(1). Disponible en: <http://transmedreports.org/index.php/ijfs/article/view/ijfs.2014.1711>
356. Deutz A, Völk F, Pless P, Fötschl H, Wagner P. Wildfleischhygienische Aspekte zu Stöberjagden auf Rot-und Rehwild. *Arch Für Leb.* 2006;57(6):197-202.
357. Mentaberre G, Porrero MC, Navarro-Gonzalez N, Serrano E, Domínguez L, Lavín S. Cattle Drive *Salmonella* Infection in the Wildlife–Livestock Interface. *Zoonoses Public Health.* 1 de noviembre de 2013;60(7):510-8.

-
358. Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, Barral M. *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Rev Sci Tech Int Epiz.* 2004;23:905–911.
359. Magnino S, Frasnelli M, Fabbi M, Bianchi A, Zanoni MG, Merialdi G, et al. The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy. En: Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayr R, Smulders FJM, editores. *Game meat hygiene in focus* [Internet]. Wageningen Academic Publishers; 2011 [citado 26 de agosto de 2016]. p. 223-44. Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.3920/978-90-8686-723-3_17
360. Sasaki Y, Goshima T, Mori T, Murakami M, Haruna M, Ito K, et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Foodborne Bacteria in Wild Boars (*Sus scrofa*) and Wild Deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 25 de octubre de 2013;10(11):985-91.
361. Weindl L, Frank E, Ullrich U, Heurich M, Kleta S, Ellerbroek L, et al. *Listeria monocytogenes* in Different Specimens from Healthy Red Deer and Wild Boars. *Foodborne Pathog Dis.* 9 de mayo de 2016;13(7):391-7.
362. Piérard D, Damme LV, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl Environ Microbiol.* 1 de noviembre de 1997;63(11):4585-7.
363. Navarro-Gonzalez N, Porrero MC, Mentaberre G, Serrano E, Mateos A, Cabal A, et al. *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars (*Sus scrofa*) and Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sharing pastures with free-ranging livestock in a natural environment in Spain. *Vet Q.* 3 de abril de 2015;35(2):102-6.
364. Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K, et al. Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. *Appl Environ Microbiol.* 1 de agosto de 2007;73(15):4769-75.
365. Jay MT, Cooley M, Carychao D, Wiscomb GW, Sweitzer RA, Crawford-Miksza L, et al. *Escherichia coli* O157: H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(12):1908–1911.
366. Laidler MR, Tourdjman M, Buser GL, Hostetler T, Repp KK, Leman R, et al. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Consumption of Locally

- Grown Strawberries Contaminated by Deer. Clin Infect Dis. 15 de octubre de 2013;57(8):1129-34.
367. Sannö A, Aspán A, Hestvik G, Jacobson M. Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. Epidemiol Infect. diciembre de 2014;142(12):2542–2547.
368. Wacheck S, Fredriksson-Ahomaa M, König M, Stolle A, Stephan R. Wild Boars as an Important Reservoir for Foodborne Pathogens. Foodborne Pathog Dis. 9 de noviembre de 2009;7(3):307-12.
369. Lehmann S, Timm M, Steinrück H, Gallien P. Detection of STEC in faecal samples of free-ranging wild and in wild meat samples. Fleischwirtschaft. 2006;4:93–96.
370. Hoffman LC, Kroucamp M, Manley M. Meat quality characteristics of springbok (*Antidorcas marsupialis*). 2: Chemical composition of springbok meat as influenced by age, gender and production region. Meat Sci. agosto de 2007;76(4):762-7.
371. Stefan R, Bud I, Ladosi D, Botha M. Researches concerning the influence of gender and age on game meat quality. Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Anim Sci Biotechnol [Internet]. 15 de diciembre de 2008 [citado 29 de agosto de 2016];65(1-2). Disponible en: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/zootehnie/article/view/977>
372. Stevenson JM. Seasonal variation in venison quality of mature, farmed red deer stags in New Zealand.–p. 1389-1396 [Internet]. En: journal of Animal Science.– Vol. 70, no. 5 (May 1992).; 2003 [citado 29 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=earth.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=007246>
373. Ugarković NK, Ugarković D. Chemical and fatty acid composition of male mouflon (*Ovis ammon musimon* Pal.) meat. Eur J Wildl Res. 22 de enero de 2013;59(4):469-75.
374. VENCAZA Productos [Internet]. [citado 1 de septiembre de 2016]. Disponible en: <http://www.vencaza.com/jabali.html>
375. Carne de Ciervo y Jabalí [Internet]. Catedral de la Caza. [citado 1 de septiembre de 2016]. Disponible en: <http://catedraldelacaza.com/c/carne-de-ciervo-y-jabali/>

-
376. Strazdina V, Jemeljanovs A, Sterna V, Ikauniece D. Nutrition value of deer, wild boar and beaver meat hunted in Latvia. *Int Proc Chem Biol Environ Eng*. 2013;53:71–76.
377. Nagy M, Mureşan C, Socaci SA, Tofană M, Fărcaş A, Biriş SE. Study on Influence of Different Types of Meat on the Quality of Meat Products. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Food Sci Technol*. 23 de noviembre de 2015;72(2):215-8.
378. Drew KR, Hogg BW. Comparative carcass production from red, wapiti and fallow deer. En: *Proceedings of the Australian Association of Animal Breeding and Genetics* [Internet]. 1990 [citado 29 de agosto de 2016]. p. 491–494. Disponible en: <http://www.aaabg.org/livestocklibrary/1990/ab90100.pdf>
379. Skobrák EB, Bodnár K, Jónás EM, Gundel J, Jávör A. The Comparison Analysis of the Main Chemical Composition Parameters of Wild Boar Meat and Pork. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol*. 31 de mayo de 2011;44(1):105-12.
380. Polak T, Rajar A, Gašperlin L, Žlender B. Cholesterol concentration and fatty acid profile of red deer (*Cervus elaphus*) meat. *Meat Sci*. noviembre de 2008;80(3):864-9.
381. Strazdina V, Jemeljanovs A, Sterna V. Fatty Acids Composition of Elk, Deer, Roe Deer and Wild Boar Meat Hunted in Latvia. *World Acad Sci Eng Technol Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Eng*. 2012;6(9):765–768.
382. Quaresma MAG, Alves SP, Trigo-Rodrigues I, Pereira-Silva R, Santos N, Lemos JPC, et al. Nutritional evaluation of the lipid fraction of feral wild boar (*Sus scrofa scrofa*) meat. *Meat Sci*. diciembre de 2011;89(4):457-61.
383. Kay RNB, Sharman G a. M, Hamilton WJ, Goodall ED, Pennie K, Coutts AGP. Carcass characteristics of young red deer farmed on hill pasture. *J Agric Sci*. febrero de 1981;96(1):79–87.
384. Medeiros LC, Busboom JR, Field RA, Williams JC, Miller GJ, Holmes B. Nutritional content of game meat. *Bull-Wyo Univ Coop Ext Serv USA* [Internet]. 1989 [citado 29 de agosto de 2016]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9149218>